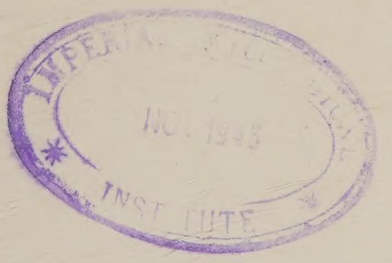
АКАДЕМИЯ НАУК СОЮЗА ССР

МИКРОБИОЛОГИЯ

MICROBIOLOGY

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
И ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

ТОМ XIV. ВЫП. 1



ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА

1945

МИКРОБИОЛОГИЯ

Ответственный редактор чл.-корр. Академии Наук СССР Б. Л. Исаченко

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

А. Ф. Войткевич, А. А. Имшенецкий,

Я. И. Раутенштейн, В. Л. Рыжков, В. О. Таусон,

Ф. М. Чистяков, В. Н. Шапошников

MICROBIOLOGY

EDITORIAL BOARD:

A. F. Woitkewich, A. A. Imšenecki,

B. L. Issatchenko (Editor), J. I. Rautenstein,

V. L. Rischkow, W. O. Tausson, F. M. Tchistiakov,

W. N. Schaposchnikov

Адрес редакции: Москва, 71, Б. Калужская, 33,
Институт микробиологии Академии Наук СССР

АКАДЕМИЯ НАУК СОЮЗА ССР

МИКРОБИОЛОГИЯ

MICROBIOLOGY

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
И ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

ТОМ XIV

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА

1945

Printed in Soviet Union

МИКРОБИОЛОГИЯ

Ответственный редактор чл.-корр. Академии Наук СССР Б. Л. Исаченко

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

А. Ф. Войткевич, А. А. Имшенецкий,
Я. И. Раутенштейн, В. Л. Рыжков, В. О. Таусон,
Ф. М. Чистяков, В. Н. Шапошников

MICROBIOLOGY

EDITORIAL BOARD:

A. F. Woitkewich, A. A. Imšenecki,
B. L. Issatchenko (Editor), J. I. Rautenstein,
V. L. Rischkow, W. O. Tausson, F. M. Tchistiakov,
W. N. Schaposchnikov

ЭНЕРГЕТИКА ПРОЦЕССА ЖИРООБРАЗОВАНИЯ

В. О. Таусон

Биологический синтез жиров имеет не только огромное практическое значение, но представляет также и большой теоретический интерес. Поэтому неудивительно, что он давно уже начал привлекать к себе внимание исследователей, в частности физиологов и биохимиков. Интерес к этому процессу особенно возрос после установления того факта, что некоторые микроорганизмы — Aspergillus flavus, Penicillium javanicum, Torula utilis, Endomyces vernalis, Oospora (Oidium) lactis и др. при подходящих условиях способны накапливать в своих клетках значительные количества жира [7, 9, 12], а также в связи с разработкой способов культивирования некоторых из указанных микробов в промышленных масштабах [8, 9, 21, 30]. Это позволило использовать сравнительно малоценное непищевое сырье — мелассу, сульфитные щелока, древесный сахар и пр. для получения значительно более ценного и нередко даже дефицитного продукта — технического и пищевого жира.

С другой стороны, существование жирообразующих микроорганизмов давало возможность значительно лучше, полнее и точнее изучить условия и химизм процесса образования жира из углеводов и продуктов их распада, ибо для исследований такого рода они являются гораздо более удобными объектами, чем высшие растения и животные. Работы в только что указанных направлениях имеют большое практическое значение: их результаты служат основой для разработки способов массового культивирования жирообразующих микробов, определения степени использования ими сырья и установления возможных максимальных выходов жира за счет различных углеродистых веществ [8, 20].

Но этим большое значение исследований, касающихся химической стороны проблемы биологического синтеза жира, не ограничивается. Они представляют огромный теоретический интерес, так как во всех деталях раскрывают перед нами весь путь, по которому происходит превращение полностью гидроксилированных углеродных цепей углеводов в цепи восстановленных атомов С, слагающих высшие жирные кислоты и углеродные скелеты аминокислот. Кроме того, результаты этих исследований, полученные современными методами биохимии и микробиологии, позволяют установить существующие при указанных превращениях энергетические соотношения, выявить основные принципы синтетических реакций и, таким образом, еще раз проверить основные положения развиваемой мною теории экзотермичности биологических синтезов [1, 2, 3].

В настоящее время, особенно благодаря трудам Haehn и Kintoff'a [13, 14], Reichel'я с сотрудниками [21, 22, 23] и других [1], химизм образования жира и жирных кислот из углеводов можно считать выясненным достаточно полно. Названные исследователи работали с чистыми культурами Endomyces vernalis и выяснили условия накопления жира этим организмом, а также установили ряд фактов, имеющих существенное значение для понимания процесса жирообразования. Из них здесь следует отметить: необходимость широкого доступа кислорода воздуха, обильное выделение углекислоты при превращении углеводов в жиры (до 35—40% потре-

[1] Подробное изложение и перечень литературы по этому вопросу см. сводки W. Franke [9], H. Fink [7], Reichel [21].

бленного сахара [7]), возможность и даже бо́льшую легкость построения жирных кислот и нейтральных жиров за счет этилового спирта, уксусной, молочной и пировиноградной кислот, ацетальдегида [7, 13], ацетальдоля и таких ненасыщенных альдегидов, как кротоновый, гексадиеналь и октатриеналь [21]. Балансные (количественные) опыты Haehn и Kintoff'a [13] с Endomyces vernalis показали, кроме того, что выход жира за счет сахара составляет несколько больше 30%.

Схема реакций превращения углеводов в высшие жирные кислоты и нейтральные жиры, предложенная в 1925 г. Haehn и Kintoff'ом [13] и подкрепленная и обоснованная ими многочисленными опытами и биохимическими данными, была потом подтверждена, с небольшими и несущественными изменениями и дополнениями, работами Reichel'я с сотрудниками [21, 22, 23] и других авторов [7, 9]. В настоящее время эта схема в основных своих чертах может быть принята как достаточно обоснованная и доказанная. Она представляется в следующем виде:

Схема 1. Превращение сахара в жир

(по Haehn и Kintoff'y [13] и Reichel'ю [21]

1. $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_3H_6O_3 \rightarrow CH_2OH \cdot CHOH \cdot CH_2OH + CH_3 \cdot CO \cdot COOH$

триоза (триозофосфат) — глицерин — пировиноградная кислота

Зимазное расщепление

2. $CH_3 \cdot CO \cdot COOH \rightarrow CO_2 + CH_3 \cdot CHO$

ацетальдегид

Декарбоксилирование

3. $CH_3 \cdot CHO + CH_3 \cdot CHO \rightarrow CH_3 \cdot CHOH \cdot CH_2 \cdot CHO$

альдоль

Конденсация

4. $CH_3 \cdot CHOH \cdot CH_2 \cdot CHO \rightarrow H_2O + CH_3 \cdot CH = CH \cdot CHO$

кротоновый альдегид

Отщепление воды

5. $CH_3 \cdot CH = CH \cdot CHO + \begin{matrix} H_2 \\ | \\ O \end{matrix} \rightarrow CH_3 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CHO$

бутиловый альдегид

$H_2C \cdot CHOH \cdot CHO$ (O·PO$_3$H$_2$ — триозофосфат)

$CH_3 \cdot CO \cdot COOH + H_3PO_4$

пировиноградная кислота

Окисление—восстановление[1]

6. $CH_3 \cdot CO \cdot COOH \rightarrow CO_2 + CH_3 \cdot CHO$

Декарбоксилирование

7. $CH_3 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CHO + CH_3 \cdot CHO \rightarrow CH_3 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CHOH \cdot CH_2 \cdot CHO$

β-окси-капроновый альдегид

Конденсация

8. $CH_3 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CHOH \cdot CH_2 \cdot CHO \rightarrow$
$\rightarrow H_2O + CH_3 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH = CH \cdot CHO$

α, β-гексиленовый альдегид

Отщепление воды

9. $CH_3CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH = CH \cdot CHO + \begin{matrix} H_2 \\ | \\ O \end{matrix} \rightarrow CH_3 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CHO$

капроновый альдегид

$H_2C \cdot CHOH \cdot CHO$ (O·PO$_3$H$_2$ — триозофосфат (фосфо-глицериновый альдегид))

$CH_3 \cdot CO \cdot COOH + H_3PO_4$

пировиноградная кислота

Окисление—восстановление[1]

[1] См. сноску 1 на стр. 5.

Дальше, для образования из капронового альдегида стеариновой или олеиновой кислоты имеется два возможных пути:

1) повторение реакций 6, 7, 8 и 9 (или 2, 3, 4 и 5), т. е. удлинение углеродной цепи вследствие присоединения все новых и новых молекул ацетальдегида и гидрирования образующихся ненасыщенных альдегидов (с одной двойной связью) водородом, получающимся при окислении триозофосфата в пировиноградную кислоту.

2) конденсация трех молекул капронового альдегида в альдегид октадеценовой (или олеиновой) кислоты и последующее превращение последнего, в окислительно-восстановительной реакции, в стеариновую кислоту:

$$CH_3 \cdot (CH_2)_{14} \cdot CH = CH \cdot CHO + H_2O \rightarrow CH_3(CH_2)_{14} \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$$

Реакция образования триглицерида (нейтрального жира) понятна и не требует дальнейших объяснений.

Первым путем прямо может быть получена любая жирная кислота с четным числом атомов углерода (в том числе и пальмитиновая). До работ Reichel'я и его сотрудников [21, 22, 23] этот путь считался наиболее вероятным.

Исследования названных авторов показали, что в культурах Endomyces vernalis высшие насыщенные альдегиды, например октиловый и децилловый, только самоокисляются до соответствующих кислот, но не конденсируются в более высокомолекулярные альдегиды (и кислоты). Гексиловый же альдегид не подвергается никаким изменениям. Напротив, такие ненасыщенные альдегиды, как гексадиеналь и октатриеналь, при тех же условиях превращаются Endomyces vernalis в высшие жирные кислоты. Поэтому на основании полученных результатов [21] предложена несколько иная, более вероятная схема реакций образования жирных кислот.

Схема 2. **Образование жирных кислот по Reichel'ю [21]**[2]

$$A.\ 2CH_3 \cdot CHO \rightarrow CH_3 \cdot CH = CH \cdot CHO + CH_3 \cdot CHO \rightarrow$$
$$\rightarrow CH_3 \cdot CH = CH \cdot CH = CH \cdot CHO$$

гексадиеналь

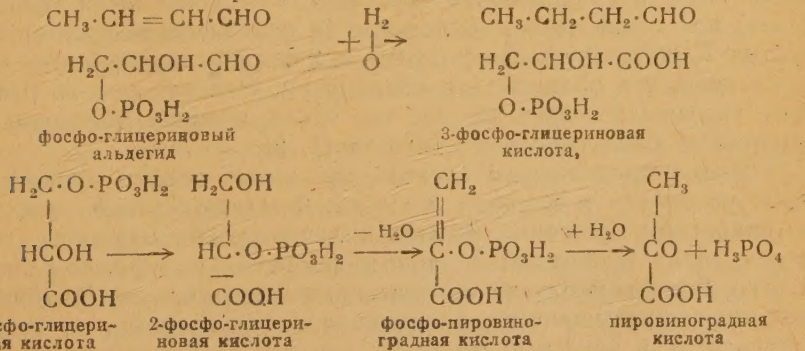
Для образования стеариновой (или олеиновой) кислоты из гексадиеналя имеются три возможности:

а) $3CH_3 = CH \cdot CH = CH \cdot CHO \rightarrow CH_3 \cdot (CH = CH)_8 \cdot COOH$

окта-дека-октаеналевая кислота

---

[1] В действительности эта реакция значительно сложнее:



[2] В эту схему, как и в схему 1, для большей ясности и наглядности мною внесены некоторые небольшие дополнения, которые по существу нисколько не изменяют оригинальных схем указанных авторов.

b) $3CH_3 \cdot CH = CH \cdot CH = CH \cdot CHO \xrightarrow{H_2} 3CH_3 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH = CH \cdot CHO \rightarrow$
гексиленовый альдегид

$\rightarrow CH_3 \cdot (CH_2 \cdot CH_2)_3 \cdot (CH = CH)_5 \cdot COOH$

c) $CH_3 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH = CH \cdot CHO + CH_3 \cdot CH = CH \cdot CH = CH \cdot CHO +$
$+ CH_3 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH = CH \cdot CHO \rightarrow CH_3 \cdot (CH_2 \cdot CH_2)_2 \cdot (CH = CH)_6 \cdot COOH$

a, b, c (кислоты) $\xrightarrow{H_2}$ олеиновая кислота $\xrightarrow{H_2}$ стеариновая кислота.

Б. Пальмитиновая кислота образуется из октатриеналя, который может получаться двумя путями:

a) $2CH_3 \cdot CH = CH \cdot CHO$

b) $CH_3 \cdot CH = CH \cdot CH = CHO + CH_3CHO$

$\rightarrow CH_3CH = CH \cdot CH = CH \cdot CH = CH \cdot CHO$
октатриеналь

$2CH_3 \cdot (CH = CH)_3 \cdot CHO \rightarrow CH_3 (CH = CH)_3 \cdot COOH \xrightarrow{H_2}$
гекса-дека-гептаеналевая кислота

$\rightarrow$ гексадеценовая кислота $\xrightarrow{H_2}$ пальмитиновая кислота.

Водород, необходимый для гидрирования ненасыщенных кислот в насыщенные, здесь также обязан своим происхождением реакции окисления триозофосфата в пировиноградную кислоту.

Как мы видим, схема Рейхеля принципиально мало отличается от схемы Хена и Кинтофа. Различия между ними сводятся, в сущности, к некоторому различию в последовательности реакций конденсации и гидрирования и к тому, что образование длинных углеродных цепей высших жирных кислот по схеме Рейхеля происходит путем конденсации немногих молекул высших ненасыщенных альдегидов (гексадиеналя и октатриеналя), тогда как по схеме Хена и Кинтофа — путем последовательного присоединения новых молекул ацетальдегида. С точки зрения характера происходящих реакций и общего баланса участвующих в процессе веществ эти различия значения не имеют.

В обеих схемах центральное место принадлежит ацетальдегиду, а основной реакцией, обеспечивающей построение восстановленных цепей жирных кислот из гидроксилированных цепей углеводов, является окислительно-восстановительная реакция, при которой происходит превращение первичноспиртовой группы фосфо-глицериновой кислоты в метильную группу пировиноградной кислоты [16, 19]. Остальные элементарные реакции — расщепление гексозо-дифосфата на две молекулы триозо-фосфата, декарбоксилирование, альдольная конденсация, отщепление воды и гидрирование ненасыщенных соединений (альдегидов и кислот) при сопряженном окислении (в окислительно-восстановительной реакции Каницаро) триозо-фосфата в 3-фосфо-глицериновую кислоту — также являются общими для обеих схем. Это как раз те реакции, которые указывались нами раньше как такие, которые обеспечивают экзотермичность биологических синтезов [1, 2].

Согласно приведенным схемам, начальные стадии процесса превращения углеводов в жирные кислоты протекают точно так же, как и при спиртовом брожении. Различна лишь судьба водорода, отщепляющегося при превращении триозо-фосфата в 3-фосфо-глицериновую кислоту. В первом случае он присоединяется по месту двойных связей, превращая ненасыщенные соединения в насыщенные, а не гидрирует ацетальдегид в этиловый алкоголь, как при спиртовом брожении.

Если мы, исходя из схемы Хена и Кинтофа, суммируем все частные реакции, протекающие при превращении сахара (глюкозы) в трипаль-

митин, то получим следующее итоговое (балансное) эмпирическое уравнение [1]:

$$(12{,}5\ C_6H_{12}O_6 + 2{,}5\ O_2 = \underset{\text{трипальмитин}}{C_{51}H_{98}O_6} + 24\ CO_2 + 26\ H_2O \qquad I$$

Оно довольно хорошо согласуется с простым балансным уравнением, которое Fink [7] считает возможным положить в основу процесса образования жирных кислот из сахара:

$$\underset{180}{C_6H_{12}O_6} = 2\ \underset{88}{CH_3{\cdot}CHO}\ (-H_2O) + \underset{4}{2H_2} + \underset{88}{2CO_2} \qquad II$$

глюкоза — ацетальдегид — водород — углекислота

$$\downarrow$$

жирные кислоты и жиры

Такие же соотношения вывели Terroine et Bonnet [28] на основании результатов своих опытов со Sterigmatocytis nigra (Aspergillus niger), что ими и было формулировано следующим уравнением:

$$4{,}5C_6H_{12}O_6 = 9CH_3{\cdot}CO{\cdot}COOH + 18\ H\ (\text{или } 9\ CH_3{\cdot}CHOH{\cdot}COOH) = \underset{\text{олеиновая кислота}}{= C_{18}H_{34}O_2} + 9CO_2 + 7H_2O + 6H \qquad III$$

Согласно этому уравнению, выход жира равен 34,85%, количество же выделяющейся углекислоты составляет 48,89% потребленного сахара (в виде углекислоты теряется 33,33 углерода глюкозы). Эти цифры довольно хорошо согласуются с находимыми экспериментально. но, несмотря на это, оба только что приведенных уравнения (II и III) не позволяют свести точный баланс веществ при превращении углеводов в жиры. Для образования из сахара трипальмитина Fink [7], исходя из своего простого балансного уравнения (II), дает следующую схему:

$$15C_6H_{12}O_6 = \underset{\text{глицерин}}{5C_3H_8O_3} + \underset{\text{трипальмитин}}{C_{51}H_{98}O_6} + 24CO_2 + 21H_2O \qquad IV$$

При этом он сам оговаривается, что о судьбе появляющихся молекул глицерина ничего не известно и что этот баланс, как и другие, не свободен от возражений.

Tamiya,[1] основываясь на своей теории дыхания [25, 26, 27], для того же процесса образования трипальмитина выводит такое общее эмпирическое уравнение

$$145C_6H_{12}O_6 = 12C_{51}H_{98}O_6 + 258CO_2 + 282H_2O \qquad V$$

С точки зрения общего баланса два последних уравнения весьма близки к выведенному нами суммарному уравнению образования трипальмитина (I), что хорошо видно из сопоставления вычисляемых на основании их выходов жира и потерь углерода в виде углекислоты:

Уравнение	Выход жира (в % потребленного сахара)	Количество CO_2 (в % потребленного сахара)	Потеря C (в % C глюкозы)
I	35,86	46,93	32,00
IV	29,88	39,11	26,67
V	37,09	43,49	29,66

Все эти цифры вполне соответствуют тем, которые находят экспериментальным путем при количественных (балансных) опытах с жирообразующими микробами [7, 13]. Однако, несмотря на это, а также и на то, что уравнения Финка (IV) и Тамийя (V) позволяют полное и точное сведение балансов веществ, выведенное нами уравнение (I) имеет перед ними ряд важных преимуществ.

Во-первых, оно представляет собою итоговое уравнение, суммирующее всю цепь последовательных, ясно и точно сформулированных частных реакций, протекающих при синтезе жира из сахара, тогда как уравнения (IV) и (V) являются грубо приближенными, чисто эмпирическими, совершенно необоснованными с точки зрения характера и последовательности отдельных реакций, составляющих интересующий нас процесс. За ними, в противоположность уравнению (I), не кроется стройной

[1] Точно такое же уравнение получим мы и в том случае, если будем исходить из схемы Рейхеля.

системы действительно легко протекающих в живой клетке биохимических реакций,— системы, дающей нам ясное и полное представление о химической стороне процесса образования жира из углеводов.

Во-вторых, в уравнения (IV) и (V), так же, как и в простое балансное уравнение Финка (II), и схему Теруана и Бонне (III) молекулярный кислород не входит. В действительности же, как показывают многочисленные опыты и подчеркнуто нами выше, для образования жира необходима широкая аэрация. Это определенно указывает на то, что в цепи реакций, приводящих к синтезу жира из сахара, имеются такие, которые протекают с участием свободного кислорода. Из схем Хена и Кинтофа и Рейхеля следует, что при превращении триозо-фосфата в пировиноградную кислоту и высокомолекулярных альдегидов в соответствующие жирные кислоты водорода получается больше, чем его требуется для гидрирования образующихся ненасыщенных продуктов в насыщенные. Этот избыток водорода окисляется кислородом воздуха, что, очевидно, является необходимым условием нормального течения процесса жирообразования. Это потребление молекулярного кислорода, вполне понятное с точки зрения приведенных схем, совершенно не находит отражения в перечисленных выше уравнениях, но точно учтено в выведенном нами итоговом уравнении (I).

За правильность схем Хена и Кинтофа и Рейхеля говорит многое и прежде всего то, что все те частные реакции, которые, согласно этим схемам, составляют сложный процесс образования жирных кислот и нейтральных жиров из углеводов, не только являются химически и биохимически возможными, но и действительно легко протекают в живых клетках. Ферментные системы — альдолаза (зимогексаза), зимаза, козимаза, карбоксилаза, различные гидразы, фосфатазы и пр., при участии которых все эти элементарные реакции могут протекать и действительно протекают в живых клетках (так же, как и in vitro), достаточно хорошо и полно исследованы как с точки зрения механизма действия, так и в отношении их широкого распространения в животных, растительных и микробных клетках [6, 10, 16]. Поэтому названные схемы и отдельные реакции, их составляющие, с биохимической точки зрения никаких серьезных сомнений и возражений не вызывают.

Затем, как отмечалось выше, многие вещества, как, например, пировиноградная и молочная кислоты, глицерин, этиловый спирт, ацетальдегид, ацетальдоль, кротоновый альдегид, гексадиеналь, октатриеналь и др., которые рассматриваются этими схемами как промежуточные продукты или родственные им соединения, оказываются отличными исходными материалами для биологического синтеза жира. Это обстоятельство является достаточно определенным указанием на то, что некоторые из перечисленных соединений действительно стоят на пути превращения углеводов в жирные кислоты.

Далее, разбираемые схемы предусматривают необходимость участия в процессе жирообразования свободного кислорода, что также полностью согласуется с экспериментально установленными фактами. Это важное, также подчеркивавшееся выше обстоятельство остальными предложенными уравнениями и схемами не учитывается. Больше того, необходимость широкой аэрации для процесса образования и накопления жира делается понятной только с точки зрения схем, предложенных Хеном и Кинтофом и Рейхелем.

Наконец, как уже отмечалось, выход жира и потеря углерода в виде CO_2, вычисляемые на основании этих схем и выведенного из них итогового уравнения (I), вполне соответствуют тем цифровым данным, которые получаются при балансных опытах. Это также целиком подтверждает правильность названных схем.

Таким образом, на основании всего изложенного выше, мы можем и должны считать схему Хена и Кинтофа, несколько измененную и дополненную благодаря работам Рейхеля, наиболее точно и полно отражающей те превращения, которые происходят при образовании жирных кислот и нейтральных жиров из углеводов. Поэтому именно эту схему мы и кладем в основу всех тех вычислений, которые необходимы для установления энергетических соотношений, существующих в действительности при биологическом синтезе жира, к чему мы и переходим.

* * *

Энергетическая сторона процесса образования жира из сахара представляет очень большой теоретический интерес. Так как удельная теплота сгорания жиров значительно больше таковой для углеводов, то указанный процесс в целом следует рассматривать как процесс накопления или концентрирования энергии. Понятно поэтому, что попытки установить энергетические соотношения, существующие при этом процессе, выяснить, как происходит указанное концентрирование энергии, делались не раз. Наиболее серьезно и обстоятельно пытались сделать это Terroine et Bonnet [28], Tamiya [25, 26, 27] и Stern [24], причем последний из названных авторов подошел к указанному вопросу с точки зрения химической термодинамики. Однако и эти попытки нельзя признать вполне удачными, так как перечисленные исследователи исходили из эмпирических, весьма приближенных уравнений, мало обоснованных или даже совершенно необоснованных биохимически.

Об уравнениях Терруана и Бонне (III) и Тамийя (V) мы уже говорили выше; здесь же следует подчеркнуть, что при своих весьма приблизительных и суммарных подсчетах они пользовались исключительно термохимическими данными. Хотя Штерн, в противоположность этим авторам, для своих вычислений применял как термохимические, так и термодинамические величины, однако полученные им результаты также нельзя признать правильными, так как он исходил, с одной стороны, из далеко не достаточно обоснованного биохимически уравнения Тамийя (V), а с другой — из уравнения

$$19C_6H_{12}O_6 = \underset{\text{тристеарин}}{2C_{57}H_{110}O_6} + 4H_2O + 49O_2{}^1, \qquad \text{VI}$$

которое не только совершенно не обосновано биохимически, но даже противоречит всему тому, что в настоящее время известно о биохимическом синтезе жира. Поэтому нет ничего удивительного в том, что в этих двух случаях он получил совершенно противоположные результаты: в случае уравнения (VI) процесс жирообразования в целом оказывается эндотермическим, протекающим с поглощением энергии, тогда как в случае уравнения (V) он, в соответствии с выводами Тамийя, является процессом экзотермическим, сопровождающимся освобождением энергии. Здесь следует подчеркнуть, что все расчеты, произведенные перечисленными выше авторами, относятся к общим суммарным балансам энергии при рассмотрении процесса образования жира в целом. Указанные авторы не касались и не могли касаться энергетической стороны частных реакций, составляющих этот сложный процесс.

Если исходить из схемы Хена и Кинтофа, исправленной в соответствии с данными Рейхеля и выведенного из нее итогового уравнения (I), то можно получить не только достаточно точные и надежные данные относительно энергетической стороны процесса образования жира в целом, но и детально проанализировать с термохимической и термодинамической точек зрения частные реакции, последовательная цепь ко-

[1] В оригинале ([24], стр. 327) вместо $49O_2$ напечатано $4O_2$, что является очевидной опечаткой.

торых приводит к синтезу жирных кислот и нейтральных жиров. Как известно [15, 24], энергетическая сторона какого-либо процесса, даже самая возможность или невозможность его определяются не столько термохимическими, сколько термодинамическими величинами и соотношениями. Поэтому при рассмотрении энергетики процесса жирообразования в целом, так же как и отдельных составляющих его реакций, на изменения свободной энергии реакций мы будем обращать внимания больше, чем на их тепловые эффекты.

В нижеследующих термодинамических и термохимических расчетах мы будем придерживаться тех обозначений, которые приняты в книге Lewis и Randall'я [15], с тем, однако, отличием, что по примеру Stern'a [24] для большего удобства и ясности ΔF и ΔH мы заключаем в скобки, когда дело идет о свободной энергии и, соответственно, теплоте образования какого-либо вещества.

Таким образом:

ΔH — тепловой эффект реакции;

(ΔH) — теплота образования данного соединения из элементов;

ΔH_{298} или (ΔH_{298}) означает, что указанные величины измерены при 298° абс. температуры, т. е. при 25° С.

ΔF°_{298} — изменение свободной энергии реакции, при условии, что все участники реакции находятся в стандартных состояниях;

ΔF_{298} — изменение свободной энергии реакции, при 25° С, когда участники реакции находятся в нестандартных состояниях;

(ΔF°_{298}) — стандартная свободная энергия образования соединения при 25° С;

a — активность вещества (термодинамическая); значок внизу указывает, об активности какого вещества идет речь: например, a_{O_2} означает, что речь идет об активности свободного кислорода;

N — число эквивалентов;

C — теплоемкость;

R — газовая константа;

T — температура (абсолютная).

Значки у химических формул справа внизу показывают, в каком аггрегатном состоянии данное вещество входит в реакцию или получается в результате ее: твердом (s), жидком (l) или газообразном (g).

Самые же расчеты мы будем производить в основном теми способами, которыми пользовался в своей книге Stern [24], в частности, в главе 10.

Рассмотрение энергетических соотношений при образовании нейтральных жиров (триглицеридов) из углеводов (глюкозы) мы начнем с вычисления термодинамических $(\Delta F^{\circ}_{298}, \Delta F_{298})$, термохимических (ΔH_{298}) и некоторых других величин (коэффициентов использования, дыхательных коэффициентов и пр.) для этого процесса в целом. Это легко сделать, исходя из итогового балансного уравнения (I), выведенного на основании схемы Хена и Кинтофа.

Образование нейтральных жиров из глюкозы

1. Образование трипальмитина

$$12{,}5C_6H_{12}O_{6(s)} + 2{,}5O_{2(g)} = \underset{\text{трипальмитин}}{C_{51}H_{98}O_{6(s)}} + 24CO_{2(g)} + 26H_2O_{(l)}$$

(ΔF°_{298})	$-12{,}5\cdot 216$[1]	0	$-202{,}9$[2]	$-24\cdot 94{,}26 - 26\cdot 56{,}56$
(ΔH_{298})	$-12{,}5\cdot 303$	0	$-575{,}1$	$-24\cdot 94{,}25 - 26\cdot 68{,}33$

[1] Величины стандартных свободных энергий образования, равно как и теплот образования глюкозы, CO_2, H_2O и др., заимствованы из таблиц, приведенных у Stern'a [24] и Lewis и Randall'я [15].

[2] См. сноску 2 на стр. 11.

$$\Delta F^{\circ}_{298} = 12{,}5 \cdot 216 - 202{,}9 - 24 \cdot 94{,}26 - 26 \cdot 56{,}56 = -1235{,}7 \text{ ккал}$$
$$H_{298} = 12{,}5 \cdot 303 - 575{,}1 - 24 \cdot 94{,}25 - 26 \cdot 68{,}33 = -826{,}18 \text{ ккал.}$$

Чтобы перейти от стандартных условий к реальным условиям течения этого процесса в живых клетках, мы должны ввести поправки на различия активностей реагирующих веществ при стандартных и указанных реальных состояниях [15, 24]. Активность жира, получающегося в твердом, нерастворимом в воде виде, равна 1; поэтому для него поправка равна 0. То же справедливо и для жидкой воды. Активность газов без особой погрешности может быть принята пропорциональной их парциальному давлению; так как давление O_2 в воздухе составляет 0,2 атм, а CO_2 — 0,0003 атм, то $a_{O_2} = 0{,}2$ и $a_{CO_2} = 0{,}0003$. Активность сахара в первом приближении можно считать пропорциональной его концентрации в растворе (см. [24], стр. 362). При 2% глюкозы в исходном питательном растворе в культурах Endomyces vernalis мы можем принять $a_{C_6H_{12}O_6} = 0{,}02$.

Тогда при условиях, соответствующих тем, которые в действительности существуют в живых клетках Endomyces vernalis в культурах,

$$\Delta F_{298} = \Delta F^{\circ}_{298} + RT \cdot 2{,}3 \left(12{,}5 \cdot \lg \frac{1}{0{,}02} + 2{,}5 \cdot \lg \frac{1}{0{,}2} - 24 \cdot \lg \frac{1}{0{,}0003}\right) =$$
$$= -1235{,}7 - 1{,}365\,(21{,}24 + 1{,}75 - 84{,}33) = -1235{,}7 - 84{,}2 =$$
$$= -1319{,}9 \text{ ккал.}$$

---

[2] Стандартные свободные энергии образования трипальмитина, тристеарина и триолеина могут быть вычислены приближенно способом, применявшимся Stern'ом [24] (стр. 317 и 327). Именно, сначала по приближенной формуле Nernst'a, из теплоты сгорания, например, трипальмитина вычисляют изменение свободной энергии при полном сгорании трипальмитина в стандартных условиях по уравнению;

$$C_{51}H_{98}O_{6(s)} + 72{,}5\ O_2 = 51\ CO_{2(g)} + 49\ H_2O_{(l)}:$$
$$\Delta F^{\circ}_{298} = \Delta H_{298} - RT \cdot 2{,}3\ [(N_{CO_2} - N_{O_2}) \cdot 1{,}75 \cdot \lg T + N_{CO_2} \cdot C_{CO_2} - N_{O_2} \cdot C_{O_2}] =$$
$$= -7579{,}8 - 1{,}365\ [-21{,}5 \cdot 1{,}75 \cdot \lg 298 + 51 \cdot 3{,}2 - 72{,}5 \cdot 2{,}8] = -7579{,}8 +$$
$$+ 1{,}365\ [93{,}1 + 39{,}8] = -7579{,}8 + 181{,}4 = -7398 \text{ ккал.}$$

Тогда, исходя из найденной величины и пользуясь тем же уравнением, определяют стандартную свободную энергию (и теплоту) образования трипальмитина:

$$C_{51}H_{98}O_{6(s)} + 72{,}5O_{2(g)} = 51\ CO_{2(g)} + 49\ H_2O_{(l)}$$
$$(\Delta F^{\circ}_{298})\ ? \qquad 0 \qquad -51 \cdot 94{,}26 - 49 \cdot 56{,}56$$
$$(\Delta H_{298})\ ? \qquad 0 \qquad -51 \cdot 94{,}25 - 49 \cdot 68{,}33$$
$$(\Delta F^{\circ}_{298}) = 7398{,}4 - 51 \cdot 94{,}26 - 49 \cdot 56{,}56 = -180{,}3 \text{ ккал на моль}$$
$$(\Delta H_{298}) = 7579{,}8 - 51 \cdot 94{,}25 - 49 \cdot 68{,}33 = -575{,}12 \text{ ккал на моль.}$$

Для тристеарина и триолеина (ΔF°_{298}) вычисляются, соответственно, в — 167,3 и — 75,74 ккал на моль.

Однако этот способ весьма неточен. Поэтому мы, как и многие другие авторы (см., например, [11]), предпочитаем пользоваться более точным и надежным методом оценки энтропий, при котором стандартные свободные энергии образования вычисляются из теплот образования по формуле $\Delta F = \Delta H - T\Delta S$. По этому методу энтропия соединения определяется сложением, причем принимается для H — + 10,6, для —C— — 13,6, для —O— + 2,0, для O = + 21,2 кал, а для каждой вторичной OH-группы начинается по 3,0 из общей (суммарной) величины.

Для энтропии элементов при 25°C приняты величины: для O + 1,3, для H + 14,8 и для O + 24,5 кал, Тогда вычисления стандартной свободной энергии образования, например трипальмитина, располагаются следующим образом (при 25°C):

$$T\Delta S = 298\ [51(-13{,}6 - 1{,}3) + 98\ (10{,}6 - 14{,}8) + 3\ (2 - 24{,}5) + 3 \cdot (21{,}2 - 24.5)] =$$
$$= -298 \cdot 1248{,}9 = -372172{,}2 \text{ кал.} = -372{,}2 \text{ ккал}$$
$$(\Delta F^{\circ}_{298}) = -575{,}1 + 372{,}2 = -202{,}9 \text{ ккал на моль.}$$

Теплоты образования вычисляются так же, как у Штерн; см., кроме того, [5].

Таким образом, в целом процесс превращения глюкозы в трипальмитин протекает с уменьшением свободной энергии системы. И по термохимическим расчетам он также оказывается экзотермическим, что вполне соответствует данным Тамийя [25, 26, 27]. Это означает, что рассматриваемый процесс, в противоположность господствовавшему до сих пор взгляду, не только не требует для своего осуществления затраты энергии извне, но даже сопровождается выделением значительного количества ее, а именно 1319,9 ккал, на г-моль, или $\frac{1319,9}{805,78} = 1,636$ ккал на 1 г образовавшегося трипальмитина.

Коэффициент использования свободной энергии (E_F) и тепловой энергии (E_H) (коэффициенты полезного действия) при образовании трипальмитина из глюкозы могут быть легко вычислены на основании уравнения:

$$12,5C_6H_{12}O_6 + 2,5O_2 = C_{51}H_{98}O_6 + 24CO_2 + 26H_2O$$
$$-12,5\cdot 709,71^1 \quad 0 \quad -7551,5^1 \quad -1319,9$$
$$-12,5\cdot 672,48^2 \quad 0 \quad -7579,8^2 \quad -826,18$$

$E_F = \frac{7551,5}{8871,4} = 85,12\%$; потеря свободной энергии составляет 14,88% ее запаса в исходной глюкозе.

$E_H = \frac{7579,5}{8406,0} = 90,18\%$; потеря тепловой энергии равна 9,82% ее запаса в исходной глюкозе.

На основании итогового балансного уравнения (I) могут быть вычислены также максимальный исходный выход (коэффициент использования вещества) и дыхательный коэффициент. Максимальный выход $= \frac{806,78}{12,5\cdot 180} = 35,775\%$; это означает, что на образование 1 г трипальмитина требуется 2,788 г глюкозы. Дыхательный коэффициент $\frac{CO_2}{O_2} = \frac{24}{2,5} = 9,60$.

2. Образование тристеарина

На основании схемы Хена и Кинтофа для образования тристеарина из глюкозы также может быть выведено итоговое балансное уравнение, аналогичное (I), исходя из которого можно произвести такие же подсчеты, какие были сделаны для трипальмитина. Это уравнение имеет следующий вид:

$$14\ C_6H_{12}O_{6(s)} + 2,5\ O_{2(g)} = C_{57}H_{110}O_{6(s)} + 27\ CO_{2(g)} + 29\ H_2O_{(l)} \qquad \text{VII}$$

тристеарин

(ΔF°_{298})	$-14\cdot 216$	0	$-195,7^3 - 27\cdot 94,26 - 29\cdot 56,56$
(ΔH_{298})	$-14\cdot 303$	0	$-609,5 - 27\cdot 94,25 - 29\cdot 68,33$
ΔF°_{298}	$= 3024,0$		$-4380,96 = -1356,96$ ккал.
ΔH_{298}	$= 4242,0$		$-5135,82 = -893,82$ ккал.

При тех же реальных условиях культивирования Endomyces vernalis, которые были приняты в случае образования трипальмитина, т. е. при $a_{C_6H_{12}O_6} = 0,02$; $a_{O_2} = 0,2$ и $a_{CO_2} = 0,0003$, $\Delta F_{298} = -1356,96 - 94,95 = -1451,91$ ккал на г-моль или 1,630 ккал на 1 г образовавшегося тристеарина.

Коэффициенты использования энергии, максимальный выход и дыхательный коэффициент вычисляются точно так же, как и в случае трипальмитина:

$$E_F = \frac{8484,0}{9935,94} = 85,39\%; \text{ потеря свободной энергии} = 14,61\%;$$

---

[1] Запасы свободной энергии глюкозы и пальмитина, равные изменению свободной энергии при полном сгорании их в реальных условиях образования жира, т. е. при $a_{C_6H_{12}O_6} = 0,02$; $a_{O_2} = 0,2$ и $a_{CO_2} = 0,0003$, в ккал на г-моль,

[2] Удельные теплоты сгорания глюкозы и трипальмитина в ккал на г-моль.

[3] См. примечание 2 на стр. 11.

$$E_H = \frac{8520,9}{9414,72} = 90,58\%;\ \text{потеря тепловой энергии} = 9,42\%.$$

Максимальный выход $= \frac{890,88}{14,180} = 35,35\%$; следовательно, для образования 1 г тристеарина требуется 2,8286 г глюкозы. Дыхательный коэффициент $= \frac{27}{2,5} = 10,80$.

3. Образование триолеина

Все интересующие нас величины для триолеина могут быть вычислены аналогичным образом на основании следующего итогового уравнения:

$$14\ C_6H_{12}O_{6(s)} + 4O_{2(g)} = C_{57}H_{104}O_{6(s)} + 27\ CO_{2(g)} + 32\ H_2O_{(l)} \qquad \text{VIII}$$

(ΔF°_{298}) — $14 \cdot 216$ $\quad 0 \quad$ $-90,4$[1] $-27 \cdot 94,26 - 32 \cdot 56,56$

(ΔH_{298}) — $14 \cdot 303$ $\quad 0 \quad$ $-494,51 - 27 \cdot 94,25 - 32 \cdot 68,33$

$\Delta F_{298} = -$ 1421,34 ккал; $\qquad \Delta H_{298} = -983,82$ ккал.

При реальных условиях ($a_{C_6H_{12}O_6} = 0,02$; $a_{O_2} = 0,2$; $a_{CO_2} = 0,0003$): $\Delta F_{298} = -1421,34 - 93,56 = -1514,90$ ккал на моль или $-1,712$ ккал на 1 г образовавшегося триолеина.

$$E_F = \frac{8421,04}{9935,94} = 84,88\%;\ \text{потеря свободной энергии} = 15,12\%.$$

$$E_H = \frac{8430,9}{9414,72} = 89,52\%;\ \text{потеря тепловой энергии} = 10,48\%.$$

Максимальный выход $= 35,11\%$, т. е. для образования 1 г триолеина требуется 2,8480 г глюкозы.

Дыхательный коэффициент $\frac{CO_2}{O_2} = \frac{27}{4} = 6,75$.

Таким образом, вычисленные для превращения глюкозы в наиболее распространенные триглицериды как термохимические, так и термодинамические величины показывают, что этот процесс в целом, являющийся с энергетической точки зрения процессом концентрирования энергии, всегда протекает с уменьшением свободной энергии, с выделением значительного количества ее, т. е. экзотермически. Это вполне согласуется с выводами Тамийя [25, 26, 27], который пришел к этому совершенно другим путем, и теми соображениями и заключениями, которые были высказаны мною относительно экзотермичности биологических синтезов вообще [1, 2, 3].

Произведенные подсчеты показывают также, что биологический синтез жиров из углеводов происходит с весьма высоким коэффициентом полезного действия (коэффициентом использования энергии), равным примерно 85% при расчете на свободную энергию и доходящим до 90%, если исходить из тепловых эффектов реакций. Потери энергии, следовательно, весьма невелики и составляют в первом случае около 15%, а во втором — 10% энергии, заключенной в исходной глюкозе.

Теоретический максимальный выход жира (коэффициент использования вещества, экономический коэффициент) во всех случаях составляет немного больше 35% (от количества потребленного углевода), что вполне соответствует экспериментальным данным.

Хорошо согласуются с результатами балансных опытов также и величины дыхательного коэффициента, значительно превышающие 1. Эти величины, колеблющиеся в пределах между 6,75 и 10,80, говорят об усиленном, по сравнению с потреблением кислорода, выделением углекислоты, что и понятно, так как, согласно схеме Хена и Кинтофа и итоговым уравнениям (I), (VII) и (VIII), вся она является «углекислотой

[1] См. примечание 2 на стр. 11.

отщепления» [7, 9], получающейся благодаря декарбоксилированию пировиноградной кислоты.

4. Частные реакции процесса жирообразования

Обратимся теперь к рассмотрению частных реакций, составляющих сложный процесс превращения углеводов в жирные кислоты, с энергетической, главным образом термодинамической точки зрения. При этом оценку изменений свободной энергии при указанных реакциях мы дадим почти во всех случаях только при стандартных состояниях участников, так как истинные активности их (так же, как и концентрации) пока неизвестны. Для наших целей этого вполне достаточно, тем более что переход от стандартных условий к реальным существенных изменений энергетических соотношений для большинства подлежащих рассмотрению реакций вызвать не может. Дело в том, что эти реакции составляют непрерывную цепь, вследствие чего концентрации различных участников всех этих реакций находятся в тесной зависимости друг от друга. Единственным возможным изменением концентрации (и активности) является уменьшение концентрации продуктов реакций благодаря дальнейшим превращениям их в последующих реакциях, что может привести только к еще большему уменьшению свободной энергии системы. От этого характер реакций, протекающих с уменьшением свободной энергии, с термодинамической точки зрения не изменится: они и при этих условиях также продолжают итти с освобождением энергии. Так как почти все интересующие нас здесь реакции, как мы увидим ниже, протекают с уменьшением свободной энергии, то все только что сказанное относится и к ним.

Исключением является лишь реакция расщепления глюкозы на две молекулы триозы, вернее гексозо-дифосфата на два триозо-фосфата. Так как эта реакция, кроме того, представляет особый интерес и в другом отношении, то на ней мы остановимся несколько подробнее, чем на остальных. Однако при этом нам придется ограничиться рассмотрением реакции расщепления глюкозы на две молекулы триозы, так как никаких термохимических и термодинамических данных для фосфорилированных продуктов пока не имеется. Аналогичные упрощения мы вынуждены сделать также и при рассмотрении других реакций, в которых участвуют фосфорные эфиры.

Теплоты образования участников всех рассматриваемых ниже реакций частью заимствованы из книги Stern'a [24], частью вычислены общепринятым способом из теплот сгорания, приведенных в Chemiker Kalender [5]. Стандартные свободные энергии образования для некоторых веществ взяты нами у Stern'a [24], Lewis'a и Randall'я и Franke [11], для других же — вычислены из теплот образования методом оценки энтропий по константам, приведенным у последнего из названных авторов [11] [1], и из теплот сгорания по приближенному уравнению Нернста [1] и затем проверены путем сравнения с табличными величинами стандартных энергий образования близких к ним соединений. Эти способы вычисления являются приближенными, и результаты их не могут, конечно, претендовать на очень большую точность, но для наших целей они вполне пригодны.

1) *Зимазное расщепление*

а) $C_6H_{12}O_6 = 2CH_2OH \cdot CHOH \cdot CHO$

глицериновый альдегид

(ΔF°_{298}) — 216 — 2·106,0

(ΔH_{298}) — 303 — 2·144,65

$\Delta F^\circ_{298} = 216 - 212 = +4{,}0$ ккал; $\Delta H_{298} = 303 - 289{,}3 = +13{,}7$ ккал.

[1] См. примечание 2 на стр. 11.

Как видим, осуществление этой реакции связано с увеличением свободной энергии системы; следовательно, термодинамически она невозможна (см. ниже), по крайней мере при указанных стандартных условиях. В действительности же, как известно, эта реакция расщепления легко протекает как в живой клетке, так и in vitro в присутствии соответствующей ферментной системы (зимогексазы) [16] и является широко распространенной, так как разнообразные превращения углеводов в другие вещества в подавляющем большинстве случаев начинаются именно с нее. Таким образом, получается противоречие между результатами термодинамического (и термохимического) анализа и данными опыта. Но противоречие это только кажущееся; это хорошо и полно выясняется из последующего изложения.

Предположим,— и на это, как мы увидим ниже, имеется достаточно оснований,— что концентрация образующейся триозы (глицеринового альдегида), вследствие непрерывного изменения (окисления) ее в последующей реакции, составляет всего лишь 5% от концентрации исходной глюкозы. Так как термодинамические активности веществ можно принимать в первом приближении пропорциональными их концентрациям, то при сделанном допущении будем иметь:

$$a_{C_6H_{12}O_6} = 0{,}02;\quad a_{C_3H_6O_3} = 0{,}001.$$

Тогда

$$\Delta F_{298} = \Delta F^\circ_{298} + RT\left(\ln\frac{1}{0{,}02} - 2\cdot\ln\frac{1}{0{,}001}\right) = 4 +$$

$$+ 1{,}365\left(\lg\frac{1}{0{,}02} - 2\lg\frac{1}{0{,}001}\right) = +4{,}0 + 1{,}365\ (1{,}699 - 2\cdot 3) =$$

$$= 4{,}0 - 5{,}87 = -1{,}87 \text{ ккал.}$$

Таким образом, при указанных условиях реакция расщепления глюкозы на две триозы протекает с уменьшением свободной энергии и, следовательно, становится термодинамически возможной.

На основании приведенных данных для этой реакции легко может быть вычислена константа равновесия. Так как при равновесии системы изменение свободной энергии (равное максимальной полезной работе) $\Delta F = 0$, то

$$\Delta F_{298} = 0 = +4{,}0 - 1{,}365\left(\lg\frac{1}{0{,}02} - 2\lg\frac{1}{a_{C_3H_6O_3}}\right),$$

откуда $a_{C_3H_6O_3} = 0{,}004845$.

Так как, по условию, a пропорциональны концентрациям c, то при $c_{C_6H_{12}O_6} = 0{,}02$, $c_{C_3H_6O_3} = 0{,}004845$. Тогда константа этой реакции при 25° С

$$K = \frac{c^2\,(\text{триоза})}{c\,(\text{глюкоза})} = \frac{(0{,}004845)^2}{0{,}02} = 0{,}001174 = 1{,}174\cdot 10^{-3}.$$

Полученная величина весьма близка к той (при 20° С $K = 1{,}5\cdot 10^{-3}$), которая была найдена экспериментально Meyerhof и Lohmann'ом [17] для константы равновесия реакции:

гексозо-дифосфат ⇆ 2 диоксиацетон-фосфат.

Произведенные здесь расчеты и их результаты, вполне соответствующие экспериментальным данным названных авторов, означают, что при вычисленных относительных концентрациях система глюкоза — 2 триозы (глицериновый альдегид) находится в равновесии. При относительных концентрациях триозы выше 0,004845 эта реакция протекает с уменьшением свободной энергии в сторону образования (синтеза) глюкозы из 2 триоз. При понижении же концентрации триозы ниже 0,004845 (при концентрации глюкозы $c = 0{,}02$),— например, вследствие потребления ее в последующей реакции, как это предусматривается схемой Хена и Кинтофа, или путем связывания бисульфитом, что производилось в опытах Meyerhof'а и Lohmann'а [17],— термодинамическое равновесие этой реакции сдвигается и она начинает протекать

с уменьшением свободной энергии уже в сторону расщепления глюкозы на две триозы.

Описанные энергетические (термодинамические) соотношения характерны для равновесных, обратимых реакций. Являясь основным и непременным условием обратимости, они, вне всякого сомнения, лежат в основе всех обратимых ферментативных реакций, типичным примером которых и является превращение гексозо-дифосфат $\rightleftarrows$ 2-диоксиацетонфосфат, катализируемое зимогексазой. Под влиянием одного из компонентов той же ферментной системы диоксиацетонфосфат может превращаться также обратимо в фосфоглицериновый альдегид [16, 18].

b) $2CH_2OH \cdot CHOH \cdot CHO\ (+H_2O) = CH_2OH \cdot CHOH \cdot CH_2OH +$
$+ CH_3 \cdot CO \cdot COOH$ [1] $(+H_2O)$
(окисление — восстановление)

(ΔF°_{298}) $-2 \cdot 106{,}0$ $(-56{,}56)$ $-113{,}8$ $-115{,}26$ $(-56{,}56)$
(ΔH_{298}) $-2 \cdot 144{,}65$ $(-68{,}33)$ $-159{,}3$ $-140{,}5$ $(-68{,}33)$
$\Delta F^\circ_{298} = 212{,}0 - 229{,}06 = -17{,}06$ ккал; $\Delta H_{298} = -10{,}5$ ккал.

2) *Декарбоксилирование*

$CH_3 \cdot CO \cdot COOH = CH_3 \cdot CHO + CO_2$
(ΔF°_{298}) $-115{,}26$ $-31{,}0$ $-94{,}26$
(ΔH_{298}) $-140{,}5$ $-46{,}56$ $94{,}25$
$\Delta F^\circ_{298} = 115{,}26 - 125{,}26 = -10{,}0$ ккал; $\Delta H_{298} = 140{,}5 - 140{,}81 =$
$= -0{,}31$ ккал.

Величина уменьшения свободной энергии этой реакции не вполне достоверна, на что указывает и Franke [11], у которого заимствованы приводимые здесь термодинамические данные. В действительности количество энергии, освобождающейся при этой реакции, вероятно, несколько меньше указанного (10 ккал на моль).

3) *Альдольная конденсация*

$CH_3 \cdot CHO + CH_3 \cdot CHO = CH_3 \cdot CHOH \cdot CH_2 \cdot CHO$
ацетальдоль
(ΔF°_{298}) $-31{,}0$ $-31{,}0$ $-67{,}2$
(ΔH_{298}) $-46{,}56$ $-46{,}56$ $-103{,}6$
$\Delta F^\circ_{298} = -5{,}3$ ккал; $\Delta H_{298} = -10{,}48$ ккал.

4) *Отщепление воды*

$CH_3 \cdot CHOH \cdot CH_2 \cdot CHO = CH_3 \cdot CH = CH \cdot CHO + H_2O$
кротоновый альдегид
(ΔF°_{298}) $-67{,}2$ $-15{,}75$ $-56{,}56$
(ΔH_{298}) $-103{,}6$ $-42{,}00$ $-68{,}33$
$\Delta F^\circ_{298} = -5{,}11$ ккал; $\Delta H_{298} = -6{,}73$ ккал.

5) *Окисление — восстановление* (*реакция Канницаро*)

a) $CH_3 \cdot CH : CH \cdot CHO + H_2O + CH_2OH \cdot CHOH \cdot CHO =$
$= CH_3CH_2CH_2 \cdot CHO + CH_2OH \cdot CHOH \cdot COOH$
бутиловый альдегид глицериновая кислота

[1] В действительности образование пировиноградной кислоты происходит более сложным путем (см. реакцию 5), но в данном случае это не имеет существенного значения.

(ΔF°_{298}) — 15,75 — 56,56 — 106,0 — 30,2 — 166,2
(ΔH_{298}) — 42,0 — 68,33 — 144,65 — 54,6 — 205,5

$(\Delta F^\circ_{298}) = 178{,}3 - 196{,}4 = -18{,}1$ ккал; $\Delta H_{298} = 254{,}98 - 260{,}1 = -5{,}12$ ккал.

b) $CH_2OH \cdot CHOH \cdot COOH = CH_3 \cdot CO \cdot COOH + H_2O$

(ΔF°_{298}) — 166,2 — 115,26 — 56,56
(ΔH_{298}) — 205,5 — 140,5 — 68,33

$\Delta F^\circ_{298} = -5{,}62$ ккал; $\Delta H_{298} = -3{,}33$ ккал.

Кроме этих пяти основных реакций, многократное чередование которых[1] приводит к превращению глюкозы в альдегиды высших жирных кислот, следует рассмотреть с энергетической точки зрения еще конечные реакции, благодаря которым из высокомолекулярных альдегидов образуются высшие жирные кислоты и нейтральные жиры.

Таких реакций три, а именно:

6) *Окисление водорода*

Последний получается, как указывалось выше, в некотором избытке при образовании ацетальдегида из глюкозы. Избыток этот должен быть окислен, как сказано, свободным кислородом, что и обусловливает необходимость широкой аэрации при жирообразовании:

$$H_2 + \frac{1}{2} O_2 = H_2O; \quad \Delta F^\circ_{298} = -56{,}56 \text{ ккал}; \quad \Delta H_{298} = -68{,}33 \text{ ккал}.$$

7) *Окисление высших альдегидов в высшие жирные кислоты*

Для этого имеются две возможности:

а) Окисление свободным кислородом:

$$\underset{\text{альдегид пальмитиновой кислоты}}{CH_3 \cdot (CH_2)_{14} \cdot CHO} + \frac{1}{2} O_2 = \underset{\text{пальмитиновая кислота}}{CH_3 \cdot (CH_2)_{14} \cdot COOH}$$

(ΔF°_{298}) — 26,0 — 86,0
(ΔH_{298}) — 140,0 — 200,5

$\Delta F^\circ_{298} = -60{,}0$ ккал; $\Delta H_{298} = -60{,}5$ ккал.

b) Окисление за счет кислорода воды (в окислительно-восстановительной реакции Канницаро) при одновременном гидрировании ненасыщенного, например кротонового, альдегида в насыщенный:

$$CH_3 \cdot (CH_2)_{14} \cdot CHO + H_2O + CH_3 \cdot CH : CH \cdot CHO = CH_3 \cdot (CH_2)_{14} \cdot COOH + CH_3 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CHO$$

(ΔF°_{298}) — 26,0 — 56,56 — 15,75 — 86,0 — 30,2
(ΔH_{298}) — 140,0 — 68,33 — 42,00 — 200,5 — 54,6

$\Delta F^\circ_{298} = 98{,}31 - 116{,}2 = -17{,}89$ ккал; $\Delta H_{298} = 250{,}33 - 255{,}1 = -4{,}77$ ккал.

[1] Реакции 3, 4 и 5а, строго говоря, не повторяются, так как в последующих реакциях этих типов реагируют альдегиды с постепенно возрастающим молекулярным весом (см. схему 1), так что чередуются, собственно, реакции определенных указанных типов. Однако, с энергетической точки зрения, это существенного значения не имеет.

8) *Образование нейтрального жира*

$$3CH_3\cdot(CH_2)_{14}\cdot COOH + CH_2OH\cdot CHOH\cdot CH_2OH = C_{51}H_{98}O_6 + 3H_2O$$

трипальмитин

$(\Delta F°_{298})$	$-3\cdot 86,0$	$-113,8$	$-202,9$	$-3\cdot 56,56$
(ΔH_{298})	$-3\cdot 200,5$	$-159,3$	$-575,1$	$-3\cdot 68,33$

$\Delta F°_{298} = -0,76$ ккал; $\Delta H_{298} = -19,20$ ккал.

Результаты термохимических и особенно термодинамических подсчетов для этой реакции не вполне точны и надежны, так как точных и проверенных данных о стандартной свободной энергии образования трипальмитина не имеется и ее величина может быть вычислена лишь приближенно. Ошибка же в несколько калорий в данном случае, естественно, существенным образом влияет на окончательные результаты. Но как бы то ни было, рассматриваемая реакция является равновесной и обратимой. С небольшим уменьшением свободной энергии она протекает даже при активностях глицерина и воды, принятых нами равными единице.

Если же предположить,— а это не только допустимо, но даже почти обязательно,— что в действительности активность воды при рассматриваемом превращении значительно меньше единицы, то данная реакция будет протекать со значительно бо́льшим уменьшением свободной энергии. Тогда неточность величины свободной энергии образования трипальмитина будет иметь меньшее значение. С другой стороны, существенное уменьшение активности глицерина (например, в 10 раз, вследствие понижения концентрации) неизбежно вызовет смещение термодинамического равновесия в сторону расщепления триглицерида на глицерин и жирные кислоты.

Приведенные подсчеты показывают, что все частные реакции, из которых складывается сложный процесс превращения углеводов в жирные кислоты и нейтральные жиры, протекают с уменьшением свободной энергии и, следовательно, являются термодинамически возможными. При этом две из них — первая (расщепление глюкозы на две триозы) и последняя (образование триглицерида), как равновесные и обратимые, с уменьшением свободной энергии протекают в сторону, обеспечивающую синтез жира, только при известных условиях, именно при определенных относительных концентрациях (термодинамических активностях) участников реакций. Ни одна из рассмотренных реакций не только не требует для своего осуществления притока энергии извне, но даже, наоборот, все они протекают с освобождением ее; большинство их даже сопровождается выделением значительных количеств тепла.

Таким образом, экзотермичен не только процесс образования жира из глюкозы в целом; экзотермичными (вернее, экзоэнергетичными) оказываются также и все частные реакции, составляющие его. Это существенным образом подтверждает все те данные и положения, которые были высказаны нами [1, 2, 3] относительно экзотермичности биологических синтезов вообще.

Вместе с тем, полученные здесь результаты детального термохимического и термодинамического анализов одного из важных биохимических процессов, так же как и вся теория экзотермичности биологических синтезов в целом, находятся в полном согласии с одним из основных положений химической термодинамики, сформулированным Люисом и Рендалем ([15], стр. 117 русского перевода) в следующем виде: «...таким образом, если нам известно значение ΔF для любой изотермической реакции и если это значение оказывается положительным, мы знаем, что в указанном направлении реакция термодинамически невозможна. Если, наоборот, значение отрицательно, то процесс может происходить и в действительности происходит, хотя бы даже и с неизмеримо малой скоростью».

Как указывалось выше, две частные реакции, представляющие собою первое и последнее звенья цепи превращений глюкозы в жир, как протекающие с весьма малыми изменениями свободной энергии, яв-

ляются в действительности равновесными и обратимыми. С уменьшением свободной энергии в направлении синтеза жира они идут только при определенных относительных концентрациях компонентов реагирующих систем, причем некоторые из этих концентраций хотя и невелики, но вполне измеримы. В этих случаях уже сравнительно небольшие, также поддающиеся достаточно точному определению изменения относительных концентраций компонентов вызывают существенные смещения положения термодинамического равновесия и заставляют указанные реакции итти в обратном направлении. Они обратимы именно потому, что осуществляются при весьма малых изменениях свободной энергии.

Все же остальные рассмотренные частные реакции протекают с гораздо более значительным уменьшением свободной энергии и идут в указанных направлениях практически при всех условиях, возможных в живой клетке. Хотя теоретически их также можно было бы рассматривать как равновесные и обратимые, однако в действительности, чтобы заставить эти реакции итти в противоположном направлении, необходимы такие огромные разницы концентраций, которые либо невозможно создать, либо фактически они не приводят к желаемым результатам.

На самом деле, чтобы сдвинуть термодинамическое равновесие, например, реакции 5а так, чтобы она протекала в обратном направлении, необходимо либо увеличить концентрации (вернее, активности) бутилового альдегида и глицериновой кислоты в $4{,}27 \cdot 10^6$ раз[1], либо в такое же число раз уменьшить концентрации (активности) кротонового и глицеринового альдегидов. При измеримых исходных концентрациях первое просто невозможно. Второе же означает, что концентрация конечных продуктов обратной реакции (кротонового и глицеринового альдегидов) ничтожно мала (ниже $4{,}27 \cdot 10^{-6}$), т. е. практически равна нулю. А это, в свою очередь, значит, что данная реакция в действительности необратима.

Таким образом, реакции, протекающие со значительным уменьшением свободной энергии и теоретически часто рассматриваемые как обратимые, фактически являются необратимыми, так как условия, необходимые для того, чтобы такая реакция с ощутимыми результатами могла протекать с уменьшением свободной энергии в обратном направлении, созданы быть не могут и в действительности никогда не создаются. Следовательно, экзотермические процессы, состоящие из цепи реакций такого типа и происходящие с выделением значительного количества энергии, по самой своей сущности являются необратимыми. Необратимы, конечно, также и все те рассмотренные частные реакции при жирообразовании, которые протекают с сравнительно значительным уменьшением свободной энергии.

Из этого следует, что, несмотря на обратимость двух звеньев (первого и последнего) цепи превращений углеводов в нейтральные жиры, именно благодаря необратимости остальных промежуточных реакций, весь процесс синтеза жира в целом также необратим. Следовательно, обратное превращение жиров в углеводы должно происходить путем, совершенно отличным от того, каким осуществляется синтез жиров из углеводов. Это заключение, выведенное на основании результатов энергетического, главным образом термодинамического анализа реакций, слагающих процесс образования жира из глюкозы, полностью соответствует экспериментальным данным, полученным при биохимических исследованиях путей окислительного распада высших жирных кислот.

Действительно, как теперь установлено [4, 29], в живом организме всякая высшая жирная кислота с четным числом атомов углерода бла-

[1] Обозначив искомую активность (концентрацию) через x, по условию равновесия имеем: $\Delta F_{298} = 0 = -18{,}1 + 1{,}365 \cdot 2 \lg \frac{x}{1}$; отсюда $\lg x = \frac{18{,}1}{2 \cdot 1{,}365} = 6{,}6302$; $x = 4{,}27 \cdot 10^6$.

годаря β-окислению распадается на жирную кислоту, содержащую на 2 углеродных атома меньше, и на уксусную кислоту. Этот окислительный распад может быть изображен следующей схемой:

Схема 3. **Окислительный распад жирных кислот**

$CH_3(CH_2)_{14}\cdot\overset{\beta}{C}H_2\cdot CH_2COOH$	Стеариновая кислота
$+O\ \downarrow$	
$CH_3\cdot(CH_2)_{14}\cdot CHOH\cdot CH_2\cdot COOH$	β-окси-стеариновая кислота
$+O\ \downarrow$	
$CH_3\cdot(CH_2)_{14}\cdot CO\cdot CH_2COOH$	β-кето-стеариновая кислота
$+H_2O\ \downarrow$	
$CH_3\cdot(CH_2)_{14}\cdot COOH + CH_3\cdot COOH$	Пальмитиновая + уксусная кислоты
. . . . . и т. д.	
$\downarrow$	
$CH_3\cdot CH_2\cdot CH_2\cdot CH_2\cdot CH_2\cdot COOH$	Капроновая кислота
$+O_2\ \downarrow$	
$CH_3\cdot CH_2\cdot CH_2\cdot CO\cdot CH_2\ COOH$	β-кето-капроновая кислота
$+H_2O\ \downarrow$	
$CH_3\cdot CH_2\cdot CH_2\cdot COOH + CH_3\cdot COOH$	Масляная + уксусная кислоты
$+O_2\downarrow$	
$CH_3\cdot CO\cdot CH_2\cdot COOH$	β-кето-масляная кислота
$+H_2O\downarrow$	
$CH_3\cdot CO\cdot OH + CH_3\cdot COOH$	2-уксусная кислота

Сравнение схем 1 и 3 с полной несомненностью и убедительностью показывает, что реакции, благодаря которым происходит распад кислот, по своему характеру совершенно отличны от тех, которые приводят к их синтезу. Различны также и промежуточные продукты, через которые осуществляются эти противоположные процессы: распад жирных кислот происходит через β-окси- и β-кетокислоты, тогда как синтез их — через β-окси-альдегиды. Пути и химические механизмы синтеза и распада жирных кислот совершенно различны между собою. Таким образом, процесс образования жира и с биохимической точки зрения необратим. Об этом говорит также и то, что оба процесса — как распад, так и синтез — протекают с участием свободного кислорода.

Все это подтверждает правильность выводов, сделанных на основании результатов термохимического и термодинамического анализов реакций, приводящих к построению жирных кислот и нейтральных жиров из углеводов.

Образование жира из этилового спирта

Как уже отмечалось выше (см. стр. 1 и 8) и подчеркивалось некоторыми авторами (см., например, [7, 9, 13]), этиловый спирт является прекрасным субстратом для образования жира. Не лишено интереса поэтому рассмотрение также и этого процесса с энергетической точки зрения, с целью сравнения его с образованием жира из углеводов. Исходя из схемы Haehn'a и Kintoff'a [13] и кладя в основу те же основные реакции, не трудно представить себе ход превращения этилового спирта в жирные кислоты и нейтральные жиры. Этот процесс может быть изображен схемой 4, в которой центральное место также принадлежит ацетальдегиду.

Схема 4. **Превращение этилового спирта в жир**

1) Окисление кислородом воздуха:

$$3CH_3\cdot CH_2\cdot OH + 3O_2 = 3CH_2OH\cdot CHO + 3H_2O$$

гликолевый альдегид

2) Конденсация: $3CH_2OH \cdot CHO = C_6H_{12}O_6$.

3) Зимазное расщепление: так же, как реакция 1a и 1b схемы 1 (см. стр. 14—16).

4) Декарбоксилирование: так же, как реакция 2 схемы 1 (см. стр. 4 и 16).

5) Окисление кислородом воздуха:

$$CH_3 \cdot CH_2OH + \frac{1}{2} O_2 = CH_3 \cdot CHO + H_2O.$$

6) Альдольная конденсация: см. реакцию 3 схемы 1 (стр. 4 и 16).

7) Отщепление воды: см. реакцию 4 схемы 1 (стр. 4 и 16).

8) Окисление — восстановление:

$$\begin{matrix} CH_3 \cdot CH = CH \cdot COH \\ CH_3 \cdot CH_2OH \end{matrix} + \begin{matrix} H_2 \\ | \\ O \end{matrix} = \begin{matrix} CH_3 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CHO \\ CH_3 \cdot CHO \end{matrix} + H_2O$$

Далее, путем повторения реакций 6, 7 и 8 процесс продолжается до образования ненасыщенного окта-деценового альдегида, который гидрируется в насыщенный (стеариновый) в окислительно-восстановительной реакции типа 7 в схеме 1 (см. стр. 17), с одновременным образованием стеариновой кислоты. Постепенное удлинение углеродной цепи здесь осуществляется тем же путем, что и при образовании жиров из углеводов, с тем, однако, отличием, что в данном случае источником образования ацетальдегида и донатором водорода для гидрирования ненасыщенных альдегидов является не триозо-фосфат, как в схеме 1, а этиловый спирт (ср. реакции 5 схемы 1 и 8 схемы 4).

Исходя из схемы 4, не трудно составить итоговое балансное уравнение для образования тристеарина из этилового спирта и на основании его выяснить энергетическую сторону этого процесса в целом. Получается следующее уравнение:

$$29CH_3 \cdot CH_2OH_{(l)} + 5{,}5O_{2(g)} = C_{57}H_{110}O_{6(s)} + CO_{2(g)} + 32H_2O_{(l)} \quad \text{IX}$$

(ΔF°_{298}) $\quad -29 \cdot 41{,}74 \quad 0 \quad -195{,}7 \quad -94{,}26 \quad -32 \cdot 56{,}56$

(ΔH_{298}) $\quad -29 \cdot 66{,}34 \quad 0 \quad -609{,}5 \quad -94{,}25 \quad -32 \cdot 68{,}33$

$\Delta F^\circ_{298} = -889{,}42$ ккал; $\Delta H_{298} = -966{,}45$ ккал.

Полагая $a_{C_2H_5OH} = 0{,}02$ (2% спирта), $a_{O_2} = 0{,}2$ и $a_{CO_2} = 0{,}0003$, для реальных условий культивирования Endomyces vernalis, имеем

$$\Delta F_{298} = \Delta F^\circ_{298} + 1{,}365\left(29 \cdot \lg\frac{1}{0{,}02} + 5{,}5 \cdot \lg\frac{1}{0{,}2} - \lg\frac{1}{0{,}0003}\right) =$$

$$= -889{,}42 + 67{,}69 = -821{,}73 \text{ ккал на моль, или } \frac{821{,}73}{890{,}88} =$$

$= -0{,}9224$ ккал на грамм образовавшегося тристеарина.

Коэффициент использования энергии:

$E_F = \frac{8484{,}0}{9305{,}73} = 91{,}17\%$; потеря свободной энергии составляет 8,83% запаса ее в исходном спирте.

$E_H = \frac{8520{,}9}{9487{,}35} = 89{,}80\%$; потеря тепловой энергии $= 10{,}20\%$.

Максимальный возможный выход (коэффициент использования вещества) тристеарина из этилового спирта составляет $\frac{890{,}88}{29 \cdot 46{,}05} =$ $= 66{,}71\%$, т. е. для образования 1 г тристеарина требуется 1,499 г этилового спирта.

Схема 4, так же как и результаты произведенных на ее основе вычислений энергетических соотношений, вполне согласуется с данными балансных опытов и хорошо объясняет наблюдаемые в действительности весьма высокие выхода жира за счет этилового спирта и потребление значительного количества кислорода воздуха при этом превращении.

В целом процесс образования жирных кислот и нейтральных жиров из этилового спирта, следовательно, также оказывается экзотермическим, сопровождающимся выделением значительного количества энергии.

Что же касается энергетических соотношений при отдельных частных реакциях, составляющих этот процесс, то для большей части этих реакций (реакции 3, 4, 6 и 7 схемы 4) они были рассмотрены выше, при обсуждении схемы 1. Поэтому здесь следует остановиться на энергетической стороне тех реакций, которые не содержатся в только что названной схеме и являются специфическими для превращения этилового спирта в жир. Это реакции 1, 2, 5 и 8 схемы 4.

1) Окисление кислородом воздуха:

$$3CH_3\cdot CH_2OH + 3O_2 = 3\,CH_2OH\cdot CHO + 3\,H_2O$$

(ΔF°_{298}) $\quad -3.41{,}74 \quad 0 \quad -3.70{,}3 \quad -3.56{,}56$

(ΔH_{298}) $\quad -3.65{,}34 \quad 0 \quad -3.93{,}76 \quad -3.68{,}33$

$(\Delta F^\circ_{298}) -255{,}36$ ккал; $\Delta H_{298} = -287{,}25$ ккал.

2) Конденсация:

$$3CH_2OH\cdot CHO = C_6H_{12}O_6$$

$$\Delta F^\circ_{298} = -5{,}1 \text{ ккал}; \quad \Delta H_{298} = -21{,}72 \text{ ккал}.$$

5) Окисление кислородом воздуха:

$$CH_3CH_2\cdot OH + \frac{1}{2}\,O_2 = CH_3\cdot CHO + H_2O$$

$$\Delta F^\circ_{298} = -45{,}82 \text{ ккал}; \quad \Delta H_{298} = -48{,}55 \text{ ккал},$$

8) Окисление — восстановление

$$CH_3\cdot CH:CH\cdot CHO + H_2O + CH_3\cdot CH_2OH = CH_3\cdot CH_2\cdot CH_2\cdot CHO + CH_3\cdot CHO + H_2O$$

(ΔF°_{298}) $\quad -15{,}75 \quad -56{,}56 \quad -41{,}74 \quad -30{,}2 \quad -31{,}0 \quad -56{,}56$

(ΔH_{298}) $\quad -42{,}0 \quad -68{,}33 \quad -66{,}34 \quad -54{,}6 \quad -46{,}56 \quad -68{,}33$

$$\Delta F^\circ_{298} = -3{,}71 \text{ ккал}; \quad \Delta H_{298} = +7{,}18 \text{ ккал}.$$

При стандартных состояниях участников эта окислительно-восстановительная реакция протекает с сравнительно небольшим уменьшением свободной энергии. В действительности же разница концентраций (и, следовательно, активностей) этилового спирта и получающегося из него ацетальдегида очень велика. Концентрация первого, являющегося исходным питательным веществом в культурах Endomyces vernalis, весьма значительна (2%), тогда как концентрация второго, вследствие непрерывного потребления его в последующей реакции конденсации, может быть лишь весьма малой. Считая концентрации (и активности) кротонового и бутилового альдегидов приблизительно одинаковыми и полагая

$$a_{C_2H_5OH} = 0{,}02 \text{ и } a_{CH_3\cdot CHO} = 0{,}0002 \ (c = 0{,}02\%) \text{ получаем:}$$

$$\Delta F_{298} = \Delta F^\circ_{298} + 1{,}365\left(\lg\frac{1}{0{,}02} - \lg\frac{1}{0{,}0002}\right) = -3{,}71 - 2{,}73 = -6{,}44 \text{ ккал}.$$

Таким образом, все частные реакции, в результате которых из этилового спирта образуется нейтральный жир (тристеарин), как и в случае превращения глюкозы в жиры, протекают с уменьшением свободной энергии и, следовательно, являются термодинамически возможными. Это также в известной степени подтверждает правильность как схем 1 и 4, так и тех принципов, которые лежат в их основе.

Образование жира из ацетальдегида

Согласно рассмотренным здесь схемам, ацетальдегид является основным исходным веществом, из которого строятся длинные углеродные цепи высших жирных кислот. Поэтому весьма интересно выяснить химизм превращения этого важного соединения в жир и существующие при этом энергетические соотношения, тем более, что воз-

можность такого превращения доказана прямыми опытами (см., например, [7, 9, 13]). Придерживаясь принципов, лежащих в основе схем 1 и 4, для указанного процесса можно построить следующую схему:

Схема 5. **Превращение ацетальдегида в тристеарин**

1) Окисление кислородом воздуха

$$3CH_3 \cdot CHO + 1\frac{1}{2} O_2 = \underset{\text{гликолевый альдегид}}{3CH_2OH \cdot CHO}$$

2) Конденсация:

$$3CH_2OH \cdot CHO = C_6H_{12}O_6$$

3) зимазное расщепление, 4) декарбоксилирование, 5) альдольная конденсация и 6) отщепление воды протекают точно так же, как и соответствующие реакции в схеме 1 (реакции 1а, 1в, 2, 3 и 4, см. стр. 4 и 14—16).

7) Гидрирование

$$CH_3 \cdot CH = CH \cdot CHO + H_2 = CH_3 \cdot CH_2 \cdot CH_2CHO$$

Дальше процесс идет, как обычно, путем многократного повторения реакций 5, 6 и 7 и приводит к образованию стеаринового альдегида, который затем и превращается в стеариновую кислоту. Необходимый для гидрирования ненасыщенных альдегидов водород получается в результате окисления части ацетальдегида кислородом воды в сопряженной окислительно-восстановительной реакции Канницаро. Так как, согласно уравнению

$$8)\ CH_3 \cdot CHO + 5H_2O = 2CO_2 + 2H_2O + 5H_2,$$

одна молекула ацетальдегида может дать 5 молекул водорода, т. е. при постепенном окислении ее могут быть гидрированы 5 молекул разных ненасыщенных альдегидов, то в схеме эта весьма сложная окислительно-восстановительная реакция ради ясности заменена более простой реакцией гидрирования.

Если исходить из приведенной схемы, то для процесса образования тристеарина из ацетальдегида может быть составлено следующее итоговое балансное уравнение:

$$33{,}2CH_3 \cdot CHO_{(l)} + 1\frac{1}{2} O_{2(g)} = C_{57}H_{110}O_{6(s)} + 9{,}4CO_{2(g)} + 11{,}4H_2O_{(l)}\ X$$

$$\Delta F^\circ_{298} = -697{,}33 \text{ ккал};\ \Delta H_{298} = -765{,}24 \text{ ккал}.$$

Переходя к реальным условиям и полагая $a_{CH_3CHO} = 0{,}001$ (0,1%), $a_{O_2} = 0{,}2$ и $a_{CO_2} = 0{,}0003$, получаем:

$$\Delta F_{298} = \Delta F_{298} + 1{,}365\left(33{,}2 \lg \frac{1}{0{,}001} + 1{,}5 \lg \frac{1}{0{,}2} - 9{,}4 \lg \frac{1}{0{,}0003}\right) =$$

$$= -697{,}33 + 92{,}18 = -605{,}15 \text{ ккал}.$$

Следовательно, коэффициент использования энергии

$$E_F = \frac{8484{,}0}{9089{,}15} = 93{,}34\%;\ \text{потеря свободной энергии} = 6{,}66\%.$$

$$E_H = \frac{8520{,}9}{9249{,}6} = 92{,}12\%;\ \text{потеря тепловой энергии} = 7{,}88\%.$$

Максимальный выход $= \frac{890{,}88}{33{,}2 \cdot 44{,}03} = 60{,}94\%$, т. е. для образования 1 г тристеарина требуется 1,6408 г ацетальдегида.

Полученные результаты не вполне соответствуют экспериментальным данным и не дают достаточно удовлетворительного объяснения наблюдаемым фактам. Именно, балансные опыты [7, 13] показывают, что этиловый спирт является значительно лучшим субстратом для жирообразования и дает гораздо больший выход жира, чем ацетальдегид, что из сравнения вычисленных коэффициентов использования энергии и максимальных выходов для обоих указанных веществ усмотреть нельзя. Найденный нами на основании уравнения (X) коэффициент использования энергии ацетальдегида при превращении его в жир оказывается ненормально высоким также и по сравнению с таковым для глюкозы, тогда как экспериментальные данные не дают основания предполагать это. Кроме того, чрезвычайно малое количество кислорода, потребляемого по уравнению (X) при превращении ацетальдегида в тристеарин, также не согласуется с подчеркивавшейся не раз необходимостью широкой аэрации при жирообразовании. Очевидно, что приведенное балансное уравнение (X) не отражает истинных соотношений при образовании жира из ацетальдегида, несмотря на то, что оно выведено на основании, казалось бы, хорошо обоснованной схемы 5.

Причины указанных несоответствий результатов вычислений с данными опытов вскрывает термодинамический анализ частных реакций, составляющих рассматриваемый процесс. При этом с энергетической точки зрения здесь следует рассмотреть только реакции 1, 7 и 8, так как остальные в этом отношении были уже проанализированы раньше (схемы 1 и 4).

1) Окисление кислородом воздуха

$$3\,CH_3 \cdot CHO + 1\frac{1}{2}\,O_2 = 3\,CH_2OH \cdot CHO$$

$\Delta F^\circ_{298} = -117{,}9$ ккал; $\Delta H_{298} = -141{,}6$ ккал.

7) Гидрирование

$$CH_3 \cdot CH = CH \cdot CHO + H_2 = CH_3 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CHO$$

$\Delta F^\circ_{298} = -14{,}45$ ккал; $\Delta H_{298} = -12{,}6$ ккал.

Обе эти реакции, так же как и все остальные рассмотренные раньше, протекают с уменьшением свободной энергии и являются, следовательно, термодинамически возможными. Иначе обстоит дело в случае реакции 8:

	$CH_3 \cdot CHO$	$+ 5H_2O$	$= 2CO_2$	$+ 2H_2O$	$+ 5H_2$
(ΔF°_{298})	$-31{,}0$	$-5.56{,}56$	$-2.94{,}26$	$-2.56{,}56$	0
(ΔH_{298})	$-46{,}56$	$-5.68{,}33$	$-2.94{,}25$	$-2.68{,}33$	0

$\Delta F^\circ_{298} = +12{,}16$ ккал; $\Delta H_{298} = +63{,}05$ ккал.

Эта реакция, как связанная с увеличением свободной энергии, в целом термодинамически невозможна. Однако это еще не означает, что ацетальдегид вообще не может быть донатором водорода для гидрирования ненасыщенных альдегидов. Дело в том, что рассматриваемая реакция сама по себе сложна и может быть разложена на пять отдельных реакций, которые с энергетической точки зрения далеко не равноценны. Рассмотрим эти частные реакции в отдельности.

8a. $CH_3 \cdot CHO + H_2O = CH_3 \cdot COOH + H_2$

уксусная кислота

$\Delta F^\circ_{298} = -6{,}74$ ккал; $\Delta H_{298} = -2{,}11$ ккал.

8b. $CH_3 \cdot COOH + H_2O = CH_2OH \cdot COOH + H_2$

гликолевая кислота

$\Delta F^\circ_{298} = +21{,}66$ ккал; $\Delta H_{298} = +26{,}97$ ккал.

8c. $CH_2OH \cdot COOH + H_2O = CHO \cdot COOH + H_2O + H_2$

глиоксилевая кислота

$\Delta F^\circ_{298} = +18{,}0$ ккал; $\Delta H_{298} = +27{,}13$ ккал.

Дальнейшее окисление за счет кислорода воды возможно двумя путями:

$$8d_1.\ CHO\cdot COOH = \underset{\text{формальдегид}}{HCHO} + CO_2;\ \Delta F^\circ_{298} = -3{,}61 \text{ ккал};\ \Delta H_{298} = +8{,}5 \text{ ккал}.$$

$$HCHO + H_2O = \underset{\text{муравьиная кислота}}{HCOOH} + H_2;\ \Delta F^\circ_{298} = -7{,}59 \text{ ккал};\ \Delta H_{298} = -3{,}09 \text{ ккал}.$$

$$8e_1.\ HCOOH\cdot(+H_2O) = CO_2\ (+H_2O) + H_2$$

$$\Delta F^\circ_{298} = -9{,}56 \text{ ккал};\ \Delta H_{298} = +5{,}65 \text{ ккал}$$

или:

$$8d_2.\ CHO\cdot COOH + H_2O = \underset{\text{щавелевая кислота}}{COOH\cdot COOH} + H_2$$

$$\Delta F^\circ_{298} = +1{,}76 \text{ ккал};\ \Delta H_{298} = +2{,}76 \text{ ккал}.$$

$$8e_2.\ COOH\cdot COOH\ (+H_2O) = 2CO_2\ (+H_2O) + H_2$$

$$\Delta F^\circ_{298} = -22{,}52 \text{ ккал};\ \Delta H_{298} = +8{,}30 \text{ ккал}.$$

Из рассматриваемых реакций термодинамически возможными оказываются только три, именно 8a, $8d_1$, и $8e_1$. Реакции 8b и 8c термодинамически невозможны даже и тогда, когда они являются сопряженными с реакцией 7, так как увеличение свободной энергии при каждой из этих реакций больше, чем уменьшение свободной энергии при гидрировании кротонового (или какого-либо другого ненасыщенного) альдегида [1].

Хотя реакция $8e_2$ и возможна термодинамически, однако путь окисления гликоксилевой кислоты через щавелевую мало вероятен. Таким образом, водород для гидрирования ненасыщенных альдегидов с термодинамической точки зрения может получаться только в трех указанных выше реакциях. Реакции окисления уксусной кислоты в гликолевую и этой последней в глиоксилевую, невозможные за счет кислорода воды, могут протекать с уменьшением свободной энергии только при участии свободного кислорода, как это показывают нижеследующие энергетические данные:

$$CH_3\cdot COOH + \frac{1}{2}O_2 = CH_2OH\cdot COOH:\ \Delta F_{298} = -34{,}9 \text{ ккал};\ \Delta H_{298} = -41{,}36 \text{ ккал}.$$

$$CH_2OH\cdot COOH + \frac{1}{2}O_2 = CHO\cdot COOH;\ \Delta F_{298} = -38{,}56 \text{ ккал};\ \Delta H_{298} = -41{,}2 \text{ ккал}.$$

Следовательно, за счет одной молекулы ацетальдегида могут быть гидрированы только три молекулы ненасыщенных альдегидов, а не пять, как это предполагает реакция 8. По причине термодинамического характера она должна быть заменена суммарной реакцией:

$$CH_3\cdot CHO + 3H_2O + O_2 = 2CO_2 + 2H_2O + 3H_2, \qquad \text{XI}$$

при которой $\Delta F^\circ_{298} = -100{,}96$ ккал; $\Delta H_{298} = -83{,}61$ ккал.

Тогда, исходя из схемы 5, измененной в том смысле, что реакция 8 принимается протекающей по уравнению (XI) и состоящей, таким образом, из реакций, термодинамически возможных, мы получаем следующее итоговое балансное уравнение:

$$36CH_3\cdot CHO_{(l)} + 8{,}5O_{2(g)} = C_{57}H_{110}O_{6(s)} + 15CO_{2(g)} + 17H_2O_{(l)} \qquad \text{XII}$$

$$\Delta F^\circ_{298} = -1455{,}12 \text{ ккал};\ \Delta H_{298} = -1508{,}66 \text{ ккал}.$$

Принимая, как и раньше [уравнение (X)], для реальных условий

$$a_{CH_3\cdot CHO} = 0{,}001\ (0{,}1\%),\ a_{O_2} = 0{,}2 \text{ и } a_{CO_2} = 0{,}0003,$$

имеем:

$$\Delta F^\circ_{298} = -1455{,}12 + 83{,}40 = -1371{,}72 \text{ ккал. на г-моль}$$

или 1,5397 ккал на 1 г образовавшегося тристеарина.

При этом коэффициент использования энергии оказывается значительно более низким, так же как и максимальный возможный выход жира:

---

[1] Другими словами, сопряженные окислительно-восстановительные реакции, состоящие из элементарных реакций 7 и 8*b* или 7 и 8*c*, термодинамически невозможны потому, что осуществление их связано с увеличением свободной энергии: в первом случае $\Delta F^\circ_{298} = -14{,}45 + 21{,}66 = +7{,}21$ ккал, во втором — $\Delta F^\circ_{298} = -14{,}45 + 18{,}0 = +3{,}55$ ккал.

$$E_F = \frac{8484,0}{9855,72} = 86,08\%; \quad E_H = \frac{8520,9}{10029,6} = 84,96\%.$$

$$\text{Максимальный выход} = \frac{890,88}{36 \cdot 44,03} = 56,20\%.$$

Эти результаты, так же как и то, что, согласно уравнению (XII), при синтезе жира из ацетальдегида потребляется значительное количество кислорода, вполне соответствует указанным выше экспериментальным данным.

Я намеренно остановился так подробно на подсчетах энергетических соотношений, произведенных на основании итогового уравнения (X), несмотря на то, что они приводят к заведомо неправильным результатам. Сделано это для того, чтобы наглядно показать, что нельзя строить схемы биохимических процессов без термодинамического анализа составляющих их частных реакций. Принятие для тех или иных биохимических процессов реакций, кажущихся правильными с точки зрения стехиометрических отношений, но в действительности термодинамически невозможных, может привести и на самом деле приводит, как мы видели, к совершенно ошибочным выводам и толкованиям, которые сильно затрудняют правильное понимание путей, направлений и физиологического значения многочисленных и разнообразных биохимических процессов, происходящих в живой клетке.

* * *

Итак, рассмотрение с термохимической и термодинамической точек зрения биологического синтеза жирных кислот и нейтральных жиров из углеводов, этилового спирта и ацетальдегида определенно и бесспорно показывает, что этот процесс в целом является экзотермическим, происходящим с выделением энергии, а не с ее поглощением, как это обычно принято думать. Термодинамический анализ частных реакций, составляющих этот сложный процесс, полностью подтверждает заключение об экзотермичности его в целом. Как показывают приведенные выше подсчеты, все эти реакции протекают с уменьшением свободной энергии, т. е. «самопроизвольно», следовательно для осуществления их затраты энергии извне не требуется.

Экзотермичность одного из важнейших синтетических процессов в живом организме — построение жира из углеводов — еще раз, и притом весьма существенным образом, подтверждает правильность основных положений теории экзотермичности биологических синтезов вообще [1, 2, 3]. Это полное согласие полученных здесь результатов с положениями только что упомянутой теории приобретает особенное значение, во-первых, потому, что выводы об экзотермичности процесса жирообразования в целом и о «самопроизвольности» составляющих его реакций сделаны из результатов рассмотрения с энергетической точки зрения схем и реакций, разработанных и построенных на основании многочисленных прямых и точных биохимических данных, а не на основании энергетических соображений; во-вторых, потому, что синтез жира из глюкозы является наиболее резко выраженным случаем превращения полностью гидроксилированных цепей сравнительно бедных энергией углеводов в почти до предела восстановленные углеродные цепи высших жирных кислот, весьма богатых энергией.

Как указывалось выше, образование жира из углеводов с энергетической точки зрения является процессом концентрирования энергии. Биохимически это достигается путем накопления метильных (и метиленовых) групп, при одновременном отщеплении CO_2, причем эти метильные группы получаются вследствие превращения в них первичноспир-

товых групп в окислительно-восстановительной реакции Канницаро. Как неоднократно отмечалось выше, этот процесс связан с поглощением свободного кислорода. Таким образом, мы сталкиваемся здесь с фактом, который на первый взгляд кажется парадоксальным: образование более восстановленного соединения (жирной кислоты) из более окисленного (менее восстановленного углевода) осуществляется путем окисления. На этом, как на следствии из принципа экзотермичности биологических синтезов, мы имели уже случай останавливаться в другом месте [1, 2].

В заключение следует отметить еще одно, не лишенное интереса и значения обстоятельство, а именно: потребление свободного кислорода при образовании жира связано с окислением избытка водорода, получающегося при образовании пировиноградной кислоты из триозо-фосфата, тогда как выделение CO_2 — с отщеплением ее от этой кислоты при образовании из нее ацетальдегида. Таким образом, выделение CO_2 непосредственно не связано с поглощением кислорода. Энергия же, освобождающаяся как при окислении водорода, так и при отщеплении CO_2, не поглощается и не потребляется при синтезе жира, так как все реакции, составляющие этот процесс, протекают «самопроизвольно», с выделением энергии. Это как нельзя лучше подтверждает то положение теории экзотермичности биологических синтезов, что «дыхания», как самостоятельного энергетического процесса, дающего энергию для синтетических процессов, не существует, и что поглощение кислорода, выделение CO_2 и освобождение энергии представляют собою явления, всецело и непосредственно связанные с перестройкой исходных питательных веществ в разнообразные компоненты живой клетки [1, 2].

Рассмотрение с энергетической точки зрения процесса биологического синтеза жира и отдельных реакций, его составляющих, приводит к тому основному выводу, что исходные питательные вещества должны содержать известные запасы энергии не потому, что живая клетка использует эту энергию как таковую, для осуществления эндотермических процессов синтеза, как это обычно принимается, а потому, что эти запасы обеспечивают возможность «самопроизвольных», протекающих с уменьшением свободной энергии реакций, последовательная цепь которых приводит к перестройке исходных питательных веществ в компоненты живой клетки. При этом абсолютное количество энергии в системе: организм — питательная среда уменьшается, так как часть ее выделяется в виде тепла и рассеивается. Концентрирование энергии, происходящее при образовании жира из углеводов, также сопровождается уменьшением запаса энергии реагирующей системы и рассеянием части энергии, запасенной в исходном веществе — углеводе.

Все это, как и теория экзотермичности биологических синтезов в целом, является выражением второго принципа термодинамики, полная применимость которого к биологическим процессам несомненна.

Институт физиологии растений
им. Тимирязева
Академии Наук СССР

Получено 30. X. 1942

ЛИТЕРАТУРА

1. Таусон В. О. Микробиология, т. VII, 445, 1938; т. VIII, 787, 1043, 1939.
2. Таусон В. О. Советская наука, № 9, стр. 63, 1940.
3. Таусон В. О. ДАН СССР, 31, № 4, стр. 371, 1941.
4. Artom C. Z. physiol. Chem., 245, 276, 1937.
5. Chemiker Kalender, herausgegeben von J. Koppel. Berlin 1931. Teil III, S. 509—524.
6. Euler H. Ergebn. d. Physiol., biol. Chem. u. exper. Pharmak., 38, 1, 1936.
7. Fink H, Haehn H. u. Hoerburger W. Chemiker Ztg., 61, Nr. 68/69, S. 689, 1937.

8. Fink, H. Haehn H. u Hoerburger W. Chemiker Ztg., 61, Nr. 72, S. 723, Nr. 74, S. 744, 1937.
9. Franke W. Z. f. ges. Naturwiss., 6, Folge 5—6, 112, 1940.
10. Franke W. Angewandte Chem., 53, Nr. 51/52, 580, 1940.
11. Franke W. Biochem. Z., 258, 280, 1933.
12. Geffers H. Archiv f. Microbiol., 8, H. 1, 66, 1937.
13. Haehn H. u. Kintoff W. Chemie der Zelle u. Gewebe, 12, 115, 1925.
14. Kluyver A. Archiv f. Microbiol., 1, 181, 1930.; The Chemical Activities of Microorganisms. London 1931.
15. Lewis G. a. Randall M. Thermodynamics and the Free Energy of Chemical Substances, USA 1923. Льюис и Рандалл. Химическая термодинамика, Ленинград 1936.
16. Meyerhof O. Ergebn. d. Enzymforsch., 4, 208, 1935; Ergebn. d. Physiol., biol. Chem. u. exp. Pharmak., 39, 10, 1937.
17. Meyerhof O. u. Lohmann K. Biochem. Z., 271, 87, 1934, 273, 73, 413, 1934.
18. Meyerhof O., Lohmann K. u. Schuster Ph. Biochem. Z., 286, 301, 319, 1936.
19. Parnas J. Bull. de la Soc. de Chim. biol., 18, 53, 1936. Enzymologia, 5, 166, 1938.
20. Rippel A. Archiv f. Microbiol., 11, H. 3, 271, 1940.
21. Reichel L. Angew. Chem., 53, Nr. 51/52, S. 577, 1940.
22. Reichel L. u. Reinmuth W. Biochem. Z., 299, H. 5—6, 359, 1938.
23. Reichel L. u. Schmidt O. Biochem. Z., 300, H. 4, 274, 1939.
24. Stern K. «Pflanzen-Thermodynamik». Verlag von Julius Springer. Berlin 1933. 10. Kapitel, S. 325—330.
25. Tamiya H. Acta Phytochimica, 6, 227, 265, 1932; 7, 27, 1933.
26. Tamiya H. u. Yamagutchi S. Acta Phytochimica, 7, 43, 1933.
27. Tamiya H. «Le bilan matériel et l'énergétique des synthèses biologiques». Actualités scientifiques et industrielles, 214. Exposés de Biologie. Paris 1935.
28. Terroine E. et Bonnet R. Bull. Soc. Chim. biol., 9, 588, 1927.
29. Verkade P. Bull. Soc. Chim. biol., 18, 989, 1936.
30. Ward G., Lockwood L., May O. a. Herrick H. Industr. a. Engin. Chem., 27, No. 3, 318, 1935.

О ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЕ ВОЛЮТИНА

А. Н. Белозерский

Под волютином подразумевается клеточное включение, широко распространенное среди бактерий и других низших растений. Под влиянием определенных красок (метиленовая синь, нейтральрот и др.) волютин дает специфическую окраску и поэтому выделяется из прочих частей клетки. Термин «волютин» предложен Meyer'ом [11] по названию бактерии Spirillum volutans, у которой эти включения им впервые были изучены. По Guilliermond'у [7], зерна волютина соответствуют метахроматическим тельцам, и в настоящее время оба эти термина употребляются для обозначения одного и того же включения. Обычно считается, что зерна метахроматина (волютина) лежат непосредственно в цитоплазме бактерий. Однако, по наблюдениям Имшенецкого [2], «в живых неокрашенных клетках Spirillum volutans существуют специальные метахроматиновые вакуоли, размеры которых варируют. В центре их имеются небольшие, круглые, слегка блестящие зерна метахроматина, значительная же его часть находится в вакуоле в растворенном состоянии. В более мелких вакуолях обособленных зерен нет совершенно, и они имеют матовое гомогенное содержимое. При постзитальном окрашивании метиленовой синью, нейтральротом или брилльант-крезилблау зерна, находящиеся в центре вакуоли, окрашиваются и довольно быстро увеличиваются в своих размерах. Последнее главным образом зависит от перехода содержащегося в вакуолях метахроматина из состояния золя в гель и отложения его на поверхности ранее бывших зерен». Аналогичное выпадение метахроматина при посмертной окраске наблюдается и у грибов.

Химическая природа волютина до сих пор окончательно не установлена. Meyer [11] считал, что в состав волютина входит нуклеиновая кислота в соединении с неизвестным основанием, вероятнее всего органическим. По его мнению, волютин есть продукт не нуклеопротеидной природы. В своих суждениях он исходил из результатов реакций окрашивания, а также из того факта, что образование волютина в клетках зависело от присутствия или отсутствия фосфора в питательной среде.

К аналогичному заключению приходит Herwerden [8], которая наблюдала исчезновение волютина при обработке содержащих его клеток ферментом нуклеазой. В последующей работе Herwerden [9] усматривала нуклеальную природу волютина не только из опытов с ферментом нуклеазой, но также и из связи между образованием волютина и содержанием фосфора в среде. В последнем случае наблюдалась определенная закономерность. На средах, лишенных фосфора (неорганического или органического), в клетках не происходило накопления волютина. При помещении их в среду, содержащую фосфор, начиналось образование волютина.

Schumacher [12] на основании красочных реакций приходит к заключению, что метахроматиновые тельца дифтерийных бацилл состоят из нуклеиновой кислоты.

В противоположность распространенному мнению о нуклеальной природе метахроматина, Glaubitz [6] не нашел связи между содержанием волютина и нуклеиновой кислоты в клетках дрожжей, из чего он заключает, что волютин и нуклеиновая кислота не идентичны.

После того как в микроскопическую технику была введена фейльгеновская реакция на тимонуклеиновую кислоту, стало ясным, что если волютин и связан с нуклеиновой кислотой, то во всяком случае не с тимонуклеиновой, а, вероятнее всего, с нуклеиновой типа дрожжевой. Это вытекало из того факта, что волютин не только не давал нуклеальной реакции Фейльгена, но растворялся во время слабого кислотного гидролиза, который необходим при выполнении данной реакции.

Возможность связи волютина с нуклеиновой кислотой типа дрожжевой была показана Delaporte и Roukhelman'ом [4] и затем [5] этим авторам удалось при обработке дрожжей слабым раствором бикарбоната натрия (0,02%) при pH = 7,8 извлечь метахроматин; при этом клетки оставались живыми, и из них почти полностью исчезали метахроматиновые зерна. Из упаренных экстрактов авторы выделяли нуклеиновую кислоту путем осаждения ее спиртом и соляной кислотой. Нуклеиновая кислота получалась сразу в чистом виде, так как содержала 9,4% фосфора и 16,80% азота. Она содержала пентозы, и при ее гидролизе авторы обнаружили цитозин, а также урацил — характерный продукт распада дрожжевой нуклеиновой кислоты. Из этого опыта авторы делают заключение, что дрожжевая нуклеиновая кислота локализуется в метахроматических тельцах и не имеет никакого отношения к составу ядер дрожжевых клеток.

Таким образом, наблюдения этих авторов как будто действительно указывают на то, что в составе волютина принимает участие нуклеиновая кислота типа дрожжевой.

Мы пытались выделить нуклеиновую кислоту из Saccharomyces cerevisiae, пользуясь методом, который был описан в работе Деляпорт, но не получили положительного результата.

В противоположность Деляпорт, мы не смогли извлечь водой метахроматина. То же самое было и в случае применения слабого раствора бикарбоната натрия (0,02%). Следует указать, что для создания pH = 7,8, при котором происходило наилучшее извлечение метахроматина в работе Деляпорт, требовалась значительно бо́льшая концентрация бикарбоната, чем это было указано у автора.

Микроскопический контроль показал, что количество метахроматиновых зерен до извлечения и после извлечения оставалось без изменения. Из упаренных в вакууме водных и бикарбонатных экстрактов нам также не удавалось получить никакого осадка при обработке концентрата спиртом и соляной кислотой.

Дрожжевую нуклеиновую кислоту мы смогли извлечь только старым методом (Altmann, [3]), т. е. путем применения раствора крепкой щелочи. При этих условиях одновременно с переходом в раствор нуклеиновой кислоты происходило и исчезновение метахроматина из клеток Saccharomyces.

Возможно, что наша неудача при применении метода Деляпорт объясняется тем, что этот автор пользовался в качестве объекта для исследований культурой S. ellipsoideus, в то время как нами для той же цели была взята культура S. cerevisiae.

В дальнейшей работе мы столкнулись с продуктом, который был выделен из клеток Spirillum volutans и по всем данным относился к веществу волютина.

Для изучения химического состава протоплазмы клеток Spirillum volutans нами были получены различные фракции путем последовательной обработки бактериальной массы водой, 0,2% раствором соды и

0,2% NaOH (подробности см. Белозерский [1]). В данном случае особый интерес представляла содощелочная вытяжка, так как именно из нее и было получено вещество, которое, по нашему мнению, было связано с волютином. Водная вытяжка не представляла интереса, так как не содержала сколько-нибудь ощутимых количеств белков и нуклеиновых кислот.

При обработке бактериальной массы Spirillum volutans 0,2% раствором соды последняя быстро расходовалась, и поэтому приходилось добавлять по каплям 10% раствор соды до остающейся щелочной реакции. Из содощелочной вытяжки были получены два продукта. Первый выпадал при подкислении вытяжки уксусной кислотой, а второй — при обработке фильтрата спиртом и соляной кислотой. Первый продукт по своим свойствам и составу соответствовал нуклеопротеиду, а второй — свободной от белка нуклеиновой кислоте.

Нами исследовались культуры Spirillum volutans различного возраста. Оказалось, что возраст культуры сказывается на выходе фракции свободной от белка нуклеиновой кислоты. Двухсуточные культуры содержали на сухой вес около 12% нуклеиновой кислоты, не связанной с белком, у 4-суточных культур эта фракция лишь немногим была меньше, чем у 2-суточных, а 6-суточные культуры были совсем лишены данной фракции. Таким образом, в клетках 6-суточных культур Spirillum volutans отсутствовало вещество, содержавшееся в больших количествах (до 12%) в клетках 2- и 4-суточных культур.

Микроскопическое исследование клеток культур различного возраста после окраски метиленовой синью показало, что клетки 2- и 4-суточных культур богаты зернами волютина, в то время как клетки 6-суточных культур совсем их лишены. В последнем случае в поле зрения попадались только единичные клетки, содержавшие волютин.

При сопоставлении микроскопических наблюдений с теми продуктами, которые были выделены при экстрагировании бактериальной массы, получается полное совпадение между исчезновением в клетках волютина и выпадением у 6-суточных культур фракции нуклеиновой кислоты, не связанной с белком. Очевидно, эта фракция соответствовала волютину, и вещество, из которого она состояла, было веществом волютина. Это кажется тем более правдоподобным, что с исчезновением волютина, занимающего в клетках Spirillum volutans большой объем, одновременно выпадает фракция, содержание которой в молодых клетках, богатых волютином, также достигает значительной величины — около 12% фактического выхода на сухой вес бактерий.

Вещество волютина обладает всеми свойствами нуклеиновой кислоты и на этом основании с полным правом может быть обозначено как волютиннуклеиновая кислота. Оно полностью лишено белка, так как не дает ни одной белковой реакции. В табл. 1 приведены фактические выходы волютиннуклеиновой кислоты, выраженные в процентах на сухой вес бактериальной массы, из культур различного возраста. В той же таблице показано содержание в волютиннуклеиновой кислоте азота, фосфора, серы и пентоз. Все эти данные выражены в процентах на сухой вес волютиннуклеиновой кислоты.

Таблица 1

Возраст культуры	Фактический выход	Общий азот	Фосфор	Сера	Пентозы
2-суточные	10—12	9,21	10,53	0,93	24,67
4-суточные	8—10	9,39	10,26	0,87	23,05
6-суточные	0	—	—	—	—

Из табл. 1 видно, что волютиннуклеиновая кислота, полученная из культур различного возраста, имеет один и тот же состав.

Волютиннуклеиновая кислота является нуклеиновой кислотой типа дрожжевой. Это было установлено нами на основании изучения продуктов гидролиза волютиннуклеиновой кислоты. При ее гидролизе были обнаружены и идентифицированы ксантин, гуанин, аденин, цитозин и урацил. Кроме того, как это видно из таблицы, она содержит пентозы. Таким образом, в ее составе имеются все необходимые компоненты, свойственные дрожжевой нуклеиновой кислоте.

Однако волютиннуклеиновая кислота, как показывают аналитические данные, представленные в табл. 1, не просто дрожжевая нуклеиновая кислота. Она является телом более сложным. В ее состав входит большее количество молекул фосфорной кислоты, чем в состав обычной дрожжевой нуклеиновой кислоты. Она содержит в среднем 10,3% фосфора при 9,3% азота, в то время как обычная дрожжевая нуклеиновая кислота — 9,0% фосфора при 16% азота. Кроме того, волютиннуклеиновая кислота характеризуется еще содержанием серы. Последняя, как показало наше исследование, находится там в виде серной кислоты, эфирообразно связанной с молекулой волютиннуклеиновой кислоты. Данное заключение мы делаем на основании того, что серная кислота легко отщепляется от волютиннуклеиновой кислоты при кислотном гидролизе и из гидролизата может быть осаждена в виде сернокислого бария.

Не исключено, что остатки фосфорной кислоты, а может быть и серной, связаны с металлами, в частности с калием. Последний мы обнаружили в больших количествах в концентрате раствора после осаждения волютиннуклеиновой кислоты. В том же концентрате магния и кальция обнаружить не удалось. Остается открытым вопрос о том, связана ли волютиннуклеиновая кислота в клетках Spirillum volutans с каким-либо органическим основанием. Несомненно лишь то, что с белком она не связана.

Обсуждение результатов

Предположения прежних авторов о том, что в состав волютина входит дрожжевая нуклеиновая кислота, повидимому, соответствуют действительности. Выделенное нами из клеток Spirillum volutans вещество, которое, по всем данным, было связано с волютином, оказалось нуклеиновой кислотой типа дрожжевой. Для отличия от других нуклеиновых кислот мы предлагаем обозначать ее как волютиннуклеиновую кислоту. Последняя по своему составу является телом более сложным, чем обычная дрожжевая нуклеиновая кислота.

Волютиннуклеиновая кислота есть вещество, нагруженное значительно бо́льшим количеством фосфора, чем дрожжевая нуклеиновая кислота.

В отличие от других нуклеиновых кислот, волютиннуклеиновая кислота является эфиром серной кислоты. Это обстоятельство представляет особый интерес в связи с работой Lison'a [10]. Последний наблюдал метахроматическую окраску у тех соединений, которые являлись высокомолекулярными эфирами серной кислоты; при этом удаление серной кислоты было сопряжено с потерей окраски и, наоборот, присоединение серной кислоты — с появлением ее вновь. Отсюда автор заключил, что метахроматическая окраска при употреблении некоторых основных красок, известных гистологам в качестве средств для получения эффекта метахромазии, свойственна исключительно высокомолекулярным эфирам серной кислоты.

Из наших данных вытекает, что наблюдения Лизона не лишены

оснований, так как вещество, которое нами связывается с волютином, дающим метахромазию, действительно является высокомолекулярным эфиром серной кислоты.

Вещество волютина (метахроматина) надо рассматривать как продукт запаса, отлагающийся в клетке, а не как составную часть собственно протоплазмы. Об этом можно судить на основании того, что при его полном отсутствии сохраняется жизнедеятельность клетки.

Вещество волютина по своему составу является чрезвычайно своеобразной формой запаса, из которого, по всей вероятности, клетка может черпать материалы для построения конституционных нуклеиновых кислот (ядерной и цитоплазматической), нуклеотидов, принимающих деятельное участие в процессах обмена, и, наконец, фосфорную и серную кислоты для процессов эстерификации.

Экспериментальная часть

Гидролиз волютиннуклеиновой кислоты. Для гидролиза было взято 0,9 г вещества. Гидролиз продолжался в течение 24 часов с 25% серной кислотой. После гидролиза и освобождения гидролизата от гуминовых веществ и избытка серной кислоты пуриновые и пиримидиновые основания разделялись обычным образом с помощью серебряных солей.

Из фракции пуриновых оснований было выделено: 0,0105 г ксантина, 0,0268 г гуанина и 0,1270 г пикрата аденина. Ксантин и гуанин давали ксантиновую реакцию. Гуанин был сначала переведен в солянокислую соль, а затем в характерный пикрат с температурой разложения в 190°. Пикрат аденина после перекристаллизации из спирта имел температуру разложения в 280°. После разложения пикрата аденина можно было получить характерные кристаллы золотой соли аденина.

Из фракции пиримидинов цитозин был осажден в виде пикрата. Вес пикрата цитозина — 0,0742 г. Раствор после разложения пикрата давал интенсивную и характерную для цитозина реакцию Веелер-Джонсона. Та же реакция получалась и с маточным раствором после осаждения пикрата цитозина. Окончательно цитозин был идентифицирован определением в нем азота по Дюма-Преглю. Было найдено 24,40% N (вычислено для пикрата цитозина 24,75% N).

Из фракции урацила было выделено около 10 мг кристаллического вещества, которое представляло тонкие иголки, собранные в пучки. И вещество и маточный раствор давали характерную для урацила реакцию Веелер-Джонсона. Окончательно урацил был идентифицирован определением в нем азота по Дюма-Преглю. Было найдено 25,03% N (вычислено для урацила 25,05% N).

Таким образом, при гидролизе волютиннуклеиновой кислоты были найдены и идентифицированы все пуриновые и пиримидиновые основания, соответствующие нуклеиновой кислоте типа дрожжевой.

Пентозы определялись колориметрическим методом Юнгбурга после гидролиза волютиннуклеиновой кислоты в течение 7 часов с 30% серной кислотой и отгоне образующегося фурфурола с паром [1].

Фосфор определялся по Эмбдену. Наличие в волютиннуклеиновой кислоте серной кислоты в эфирообразной связи было установлено путем полного совпадения между данными непосредственного определения общей серы и определением количества серной кислоты после гидролиза волютиннуклеиновой кислоты соляной кислотой.

Лаборатория биохимии растений
Московского государственного университета

Получено 14. X. 1942

[1] Подробности см. А. Кизель, Практическое руководство по биохимии растений, 1934, стр. 18 и сл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белозерский А. Н. О составе протоплазмы клеток Spirillum volutans в зависимости от возраста культуры. Микробиология, т. X, стр. 185, 1941.
2. Имшенецкий А. А. Строение бактерий. Москва, 1940.
3. Altman R. Ueber Nucleinsäure. Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt., S. 524, 1889.
4. Delaporte B. et Roukhelman N. Sur la présence de la Thymine dans l'acide nucleique extrait de la levure. Rech. cytologiques et chim., C. R. Acad. Sci., 206, 1399, 1938.
5. Delaporte B. Sur les acides nucleiques des levures et leur localization. Rev. gén. Bot., 51, 449, 1939.
6. Glaubitz M. Ueber Volutin und Nucleinsäure in verschiedenen Hefen. Biochem. Z., 139, 77, 1923.
7. Guilliermond A. A propos des corpuscules métachromatiques en grains de volutin. Arch. f. Prot., 19, 289, 1910.
8. Herwerden M. van. Ueber die Nuklease als Reagent auf Nukleinsäureverbindungen der Zelle. Anat. Anz., 47, 312, 1914.
9. Herwerden M. van. Ueber das Volutin und seine chemische Zusammensetzung. Folia microbiologia, 5, 19, 1917; Chem. Cbl., I, 216, 1918.
10. Lison L. Une réaction micro- et histochimique des esters sulfuriques complexes la «réaction métachromatique». Bull. Soc. Chim. Biol., 18, 225, 1936.
11. Meyer A. Orientierende Untersuchungen über Verbreitung, Morphologie und Chemie des Volutins. Bot. Ztg., 62, 113, 1914.
12. Schumacher J. Welche chemische Substanz baut die Polkörnchen des Diphtheriebacillus. Cbl. f. Bakt, Abt. I, 88, 362, 1922.

ON THE CHEMICAL NATURE OF VOLUTIN

A. N. Belozersky

Summary

The suggestions of previous authors that the yeast nucleic acid is a component part of volutine are, probably, right. The substance extracted by us from the cells of Spirillum volutans which, according to all data, was connected with volutine proved a nucleic acid of the yeast type. In order to differentiate it from other nucleic acids we suggest to denote it as volutinnucleic acid.

The latter is a substance of a more complicated composition than the ordinary nucleic acid.

The volutinnucleic acid is a substance containing a considerably larger quantity of phosphorus than the yeast nucleic acid.

The volutinnucleic acid differs from other nucleic acids by its being the ester of sulphuric acid. This circumstance is of interest in connection with the work of Lison who connects the phenomenon of metachromasia with the presence of sulphuric acid in esteric form.

The substance of volutine (metachromatine) should be considered as a supply product stored in the cell, and not as a component of the cell protoplasm itself. This may be assumed on the ground that even in the complete absence of volutine the cell maintains its activity.

The volutine substance represents by its composition an extremely original form of supply, from which the cell seems: to be able to draw materials for building its constitutional nucleus acids (nucleus and cytoplasmatic), of nucleotides, which take an active part in metabolic processes and, finally, of phosphoric and sulphuric acids for esterification processes.

Laboratory of Plant Biochemistry
of the Moscow State University

ПОНЯТИЕ О ВИДЕ В ОБЩЕЙ И МЕДИЦИНСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Б. И. Клейн

Объединение понятия о виде в общей и медицинской микробиологии имеет одинаково важное значение для этих обеих дисциплин, так как, с одной стороны, основы микробиологической классификации положены представителями общей микробиологии (Кон, Фишер, Мигула и др.), а с другой — медицинская микробиология выработала свои специфические приемы и методы систематики, которые оказались весьма плодотворными и для общей микробиологии.

В особенности уместна постановка этого вопроса в настоящее время, когда появление известной книги академика В. Л. Комарова [3] снова оживило интерес к общим проблемам теории эволюции и дарвинизма, к вопросу о виде и к принципам эволюционной систематики в отличие от систематики номенклатурной.

Следует отметить, что вопросы бактериологической систематики в связи с учением о виде весьма актуальны не только в своей общей форме, но и в практическом аспекте.

Приведем реальный пример. Бактериолог выделяет какой-нибудь ряд атипических штаммов из кишечной группы, сбивчивых по своим углеводным и агглютационным признакам. Куда отнести их — к тифам, паратифам B и A, N. Breslau, B. suipestifer и т. д.? Каковы их границы? Куда отнести ряд атипических штаммов, выделенных у дизентерийных больных, если эти штаммы нарушают всякие правила своего обычного поведения на углеводах? Что представляют они собой: формы, разновидности или отдельные виды?

Понятие о виде В. Л. Комаров формулирует следующим образом: «Вид есть совокупность поколений, происходящих от одного общего предка и под влиянием среды и борьбы за существование обособленных отбором от остального мира живых существ; вместе с тем вид есть определенный этап в процессе эволюции».

Что могут прибавить специфические методы микробиологии к этому определению, и какие необходимы дополнения или видоизменения, чтобы определение вида, данное В. Л. Комаровым, могло быть использовано как в общей, так и в медицинской микробиологии? Эти вопросы являются предметом рассмотрения настоящей статьи.

Не вдаваясь в историю вопроса и отметив только, что основы классификации в микробиологии даны ботаниками Коном, Migula [14], Матсушита, Фишером [6] и представителями медицинской микробиологии — Flügge [9], Lehmann'ом и Neumann'ом [12], мы остановимся на главнейших принципах систематики бактерий и в особенности на новейших.

В известной монографии о микробной дизентерии Lentz'a и Prigge [13] дана практическая систематика возбудителей дизентерии,

которые разделяются на токсические и атоксические типы. Авторы, однако, не указывают, что они подразумевают под понятием «тип» и какое отношение имеет тип к форме, разновидности, виду и т. д. В таком же чисто практическом аспекте дает свою классификацию Gottschlich [10], безотносительно к общебиологическому представлению о семействе, роде и виде.

Соответственно этому и в медицинской микробиологии эти общие представления отличаются неясностью и неопределенностью. Так, например, в одном из руководств [5], относящемся к 1940 г., мы встречаем следующее определение: «Вид B. coli commune эволюционирует, приобретая признаки сперва B. coli citrovorum и т. д., с другой стороны — виды группы B coli и т. д.» Что же такое B. coli — вид или группа, и что представляет собой группа?

Несомненно, что наиболее выдержанными классификациями являются новейшие системы Берджи, Бьюкенена, Кастелляни и Янке.

Остановимся несколько на весьма распространенной классификации Берджи, наиболее принятой и у нас в Союзе. Для нее весьма характерно резкое увеличение количества отдельных видов (около 3000), которое произошло не за счет соответствующего открытия новых видов, а главным образом за счет дробления старых. Практически это, конечно, весьма удобно, так как представить виды в их взаимной связи с разновидностями, формами и т. д.— весьма трудная задача, и гораздо легче обозначить всякую совокупность небольших отличий как отдельный вид, и тогда отпадает вопрос о взаимных соотношениях о филогенезе. Но это ведет к измельчению таксономических единиц, к распылению видов, к «жорданонам» и к так называемой «номенклатурной» систематике.

Что же такое вид бактерий, по определению Берджи [1]? В русском переводе оно передано следующим образом: «Вид есть каждая отдельная порода бактерий».

Термином «порода» русский переводчик передает английское слово breed, и, таким образом, смешиваются понятия «вид» и «порода», что не способствует выяснению вопроса.

Более правильное определение вида у бактерий мы находим у Штуцера, а именно: «Видом в бактериологии следует считать совокупность всех индивидуумов, одинаковых между собой по морфологии, биохимическим и серологическим свойствам, сохраняющих свои основные признаки в процессе изменения и передающих их потомству». Эта формулировка является измененным определением Лемана и Неймана и страдает тем недостатком, что остается неизвестным, какие признаки являются «основными». Однако это определение ближе подходит к нашим современным представлениям о микробном виде; оно учитывает моменты изменчивости, но все-таки оно не вполне соответствует эволюционному учению и по своему общему характеру отличается от определения Комарова.

Что касается принципов новейшей систематики (Бьюкенен, Берджи, Кастелляни и Янке), то здесь следует отметить преобладание признаков физиологических и биохимических, а на этих признаках базируется классификация не только видов, но и родов и даже целых семейств, как, например, Nitrobacteriaceae, Azotobacteriaceae и др. Вспомним, что, например, еще Фишер принимал достаточность физиологических признаков для характеристики видов, но не родов и в особенности семейств. Во всяком случае с общебиологической точки зрения можно возражать против слишком резкого дробления видов на основании незначительных биохимических отличий, и здесь имеется широкое поле для произвольных концепций. Так, например, в 4-м издании Берджи палочка дизентерии Зонне принимается за разновидность, а в 5-м изда-

нии она уже считается отдельным видом; между тем все ее отличия сводятся к позднему свертыванию молока и агглютинационным свойствам.

Против резкого дробления видов выступил Гундель, который выдвинул, в противовес этому, учение о типах. В частности, отметим, что, по Берджи, золотистый, белый и другие стафилококки представляют собой отдельные виды; Гундель же принимает их только за типы. То же самое относится и к отдельным видам стрептококков, которые Гундель считает только типами. Вместе с тем Гундель вводит весьма неопределенное понятие — «группу». В каком отношении группа находится к виду, Гундель не определяет. Поэтому и гунделевское учение о типах не построено на общебиологическом базисе, но оно ценно как аргумент против слишком резкого дробления видов.

Специфической особенностью систематики в медицинской микробиологии являются иммунобиологические свойства микробов, а именно: агглютинация, преципитация, связывание комплемента; в последнее время медицинская микробиологическая систематика широко пользуется так называемым «рецепторным анализом» и антигенной структурой.

Эти методы, в особенности преципитация, получили широкое применение не только в медицинской, но также и в общей микробиологии и, кроме того, распространились и на ботанику (школа Метца). На этом основании можно было делать заключения классификационного характера, например о льне-кудряше и о льне-долгунце по реакции на протеолитические ферменты (Исаченко [16]).

Комаров указывает, что данные классификации по реакциям иммунитета дали в общем результаты, только подтверждающие выводы классической систематики, и поэтому они ботаническому «систематику не нужны». И действительно, у ботанических и зоологических объектов имеется для классификации целая совокупность признаков и органов и богатая морфология. Задача бактериолога-систематика гораздо труднее, чем задача ботаника или зоолога, так как морфология бактерий несравненно беднее, а проблема ядра у бактерий до сих пор еще весьма неясна.

Наличие полового процесса у бактерий, предполагаемое некоторыми учеными, не имеет подтверждения. Имшенецкий наблюдал только аутомиксию у некоторых бактерий, т. е. процесс примитивного смешения в клетке. Менее убедительны имеющиеся данные об аутогамии, и предположение о существовании у всех бактерий полового процесса (Штуцер, Покровская и др.) может считаться доказанным только после дальнейших исследований.

Учение о диссоциации Hadley [11] и цитологические исследования в ее области дали, конечно, целый ряд весьма интересных фактов; воззрения Лениса, Эндерлейна, Куна, Альмквиста и др. в высшей степени интересны, но прямого приложения в области систематики еще не получили.

Идея о наличии полового процесса у бактерий и особых стадий развития (циклогении по Эндерлейну) и профиле бактериологической систематики пока еще доставили мало прочных данных. Теория Эндерлейна о циклогении, опирающаяся на материал, не безукоризненный в смысле бактериологической техники, встретила резкий отпор со стороны представителей классической школы бактериологии (Нейфельд, Лентц) и не может считаться убедительной.

Точно так же нельзя согласиться с некоторыми авторами (например, Andrews), которые находят возможным применить в бактериологии теорию ген и принципы генетики. Вряд ли можно говорить о генах, минуя хромосомы, наличие которых у бактерий не доказано.

Если мы сопоставим между собой различные современные классификации, то увидим, что вообще в установлении таксономических единиц весьма много произвольных допущений. К прежним основным классификациям наиболее приближается система Янке, которая насчитывает 25 родов; в принципе она мало отличается от системы Фишера, который установил 22 рода. Берджи в 4-м издании своей книги довел число родов до 113. Это уже крайняя степень дробления, а между тем в 5-м издании Берджи родов еще больше. В нашей литературе Штуцер указывает 32 рода [8].

Выше мы отметили, что данные рецепторного анализа и антигенной структуры приводят к заключению о необходимости установить в систематике бактерий понятие об укрупненном виде. В соответствии с этим должно быть уменьшено и количество родов.

Топли и Вильсон объединяют 6 родов Берджи из тифознокишечных бактерий в один род Bacterium. Мы исходим из установок книги В. Л. Комарова и считаем, что наша микробиологическая систематика должна вступить на путь укрупнения вида, не доводя его, однако, до «Линнеонов»; только в таком профиле микробиологическая систематика может быть эволюционной и вместе с тем дарвинистической. Мы попытаемся здесь указать примерные схемы для различных бактериальных разделов, которые позволяют последовательно применить принцип укрупненного вида.

Так, например, имеются все основания к тому, чтобы не отделять вида дизентерии Шига от парадизентерии и отдельного вида Зонне. Их чисто биохимические отличия и даже в связи с их различной патогенностью не могут служить достаточным основанием для выделения их в отдельные виды. И это также не диктуется рецепторным анализом. Они могут быть объединены в один укрупненный вид — B. dysenteriae, причем B. paradysenteriae, по Берджи, может представлять собой разновидность (varietas) этого вида. То же самое относится и к B. Sonne, которая является только разновидностью. Палочки Флекснера и Гисса следует принимать за формы. В таком аспекте вид B. dysenteriae отражает и пластичность вида, его динамику, и принцип эволюции. Мы должны указать, что из эпидемиологических соображений Доптер пришел к такому же выводу, к которому мы приходим на основании общебиологических и иммунологических соображений в связи с патогенностью.

Остановимся подробнее на тифозно-паратифозных бактериях. И здесь точно так же все паратифы могут быть объединены в один укрупненный вид с тифом, как B. typho-paratyphosum; сюда должны войти и тиф, и Сальмонеллы Шотмюллера, Бреслау, Гертнер, Ньюпор, Суипестифер и т. д. При этом Шотмюллер, паратиф А. Кайзера, Гертнер, Суипестифер могут представлять разновидности вида B. typho-paratyphosum, а остальные представители являются только формами. В таком профиле вид B. typho-paratyphosum лучше отражает взаимную связь этих микробов и их эволюцию. Такая установка более правильна с точки зрения изменчивости, и иммунологическая, биохимическая и патогенная изменчивость этих бактерий проявляется в пределах одного и того же объединенного вида. Принципиально это правильнее и не приводит к преувеличенным представлениям об изменчивости вида. Род Эшерихия также лучше трактовать как отдельный вид из рода Bacterium и сохранить старое название Esch. coli, причем других сходных представителей следует считать разновидностями, а некоторые — формами.

Роды Эшерихия, Сальмонелла, Эбертелла, Шигелла, Аэробактер, Алкалигенес должны быть объединены в один род Bacterium. Таким образом, классификация этих бактерий по Topley и Wilson'y [15] может

оказаться более соответствующей установкам В. Л. Комарова в направлении динамичности и эволюции вида.

Особенного внимания заслуживают анаэробы, и в этом отношении весьма интересно, что Берджи, который везде стоит на позициях «распыленного» вида и в соответствии с этим умеьшенного рода, для анаэробов устанавливает только один род — Clostridium, который у Берджи разделяется на 49 видов. И действительно, если всех видов бактерий Берджи насчитывает около 3000, то по его масштабу анаэробы представляют только $^1/_{60}$ всего числа видов. Таким образом, из всего числа 113 родов для анаэробов должно быть отведено 1—2 рода.

Такой знаток анаэробов, как Вейнберг [2], в своей известной книге указывает больше 40 новых анаэробов, но возражает против причисления их к новым видам.

Считая необходимым ввести некоторые укрупнения среди анаэробных видов Берджи, мы должны обратить внимание на анаэробов газовой гангрены и внести в них известное единство. Согласно Берджи, анаэробные возбудители газовой гангрены, играющие важную роль при ранениях в настоящей войне, располагаются в такой последовательности по номерам видов Clostridium (начиная с первого вида Cl. butyricum), которую мы обозначили следующим образом: V—6—7—8—9—X—11—XII—13—14—15—16—XVII. V — это перфрингенс Вельча, X — эдематис, XII — эдематиенс, XVII — гистолитикус. В промежутках (6, 7, 8, и т. д.) располагаются биферментанс, эгенс, мультиферментанс, фаллакс, Нови, аэрофетидум, параспорогенес, Баккаринии. Мы обращаем внимание на № 11, который представляет собой B. Chauvei — возбудитель симптоматического карбункула скота.

Весьма замечательно, что между бациллом Вельча и бациллом злокачественного отека содержится 4 вида по Берджи, и, с другой стороны, между эдематиенс и гистолитикус также имеется 4 вида. Все эти «виды», по Берджи, группируются около № 11, т. е. около бацилла Chauvei, возбудителя симптоматического карбункула скота.

Получается некоторая классификационная симметрия. Если применить здесь теорию ботаника Кузнецова о hiatus'ах (пробелах), то можно видеть, что с обеих сторон вокруг бацилла Chauvei пробелы заполняют 4 вида (по Берджи). Не доказывает ли это, что все номера от V до XVII группируются около № 11, т. е. бацилла Chauvei, который соединяет в себе ряд общих свойств этих микробов? За принадлежность всех возбудителей газовой гангрены к одному виду говорит также экологический принцип и связь их всех по общему месту в огнестрельных ранениях при газовой гангрене. В пользу этого говорит также и объединенная клиническая картина газовой гангрены.

Мы полагаем, что все возбудители газовой гангрены принадлежат к одному виду бацилла Chauvei и представляют лишь его разновидности. Это представление согласуется также с воззрениями Конради, который из других соображений относил всех возбудителей газовой гангрены к разновидностям одного микроба. Такая классификация анаэробов газовой гангрены нам кажется более соответствующей общим воззрениям, высказанным в книге В. Л. Комарова.

Коснувшись рода Clostridium из семейства Bacillaceae и указав те принципы, на основании которых можно себе представить здесь укрупненный вид, возьмем богатый род Actinomyces. Когда бактериологу, привыкшему работать с различными представителями Eubacteriales, например тифознокишечной группой, со стафилококками, стрептококками и др., приходится сталкиваться в патологическом материале с друзами, нитями, с ветвлением у различных актиномицетов, то здесь уже меняются все его критерии для классификации, как будто бы дело идет о другой научной дисциплине, и в этом отношении следует отметить

точку зрения Красильникова и Крисса о самостоятельности актиномицетов в отношении систематики. Только дифтерия с ее редукционными формами и нитями и затем туберкулезная палочка с ветвлениями ассоциируются в представлении медицинского бактериолога с актиномицетами. По отношению к актиномицетам применяются принципы ботанические. И здесь действительно для систематики имеется целая гамма отличительных признаков: характер ветвления, воздушный мицелий, пигментообразование и т. д. Установка работы Крисса об изменчивости актиномицетов, опирающаяся, на широкий учет морфологических и физиологических черт с изучением модификаций при различных условиях, а также сальтаций, совпадает с нашими предположениями о необходимости укрупненного вида и для этих микроорганизмов на основании комплекса признаков. В этом аспекте обозначится и бо́льшая связь рода Actinomyces с родом Corynebacterium (дифтерийная палочка) и Mycobacterium (палочка туберкулеза), принадлежность которых к бактериям более очевидна.

Точно так же могут быть укрупнения среди кокковых микроорганизмов, принимая во внимание возможность расположения цепочками у пневмококков, а также и образования капсул у стрептококков. Далее, учитывая их экологию и патогенные свойства по отношению к легким (хотя и с некоторыми отличиями в виде крупозной или катарральной пневмонии), можно отказаться от отдельного рода Diplococcus и объединить диплококки, стрептококки в один род Streptococcus, как это делают некоторые авторы, например Гамалея, Крузе и др. Вместе с тем нет необходимости выделять Str. viridans или Str. mitior в отдельный вид. Его можно рассматривать как разновидность или даже форму гемолитического стрептококка, принимая во внимание ту смену стрептококков, гемолитического и зеленого, которая наблюдается при переходе эндокардитов из острой формы в хроническую, и изменчивость гемолитических свойств стрептококков.

Все эти вопросы еще далеки от своего разрешения; в их направлении необходимы предварительные работы для построения новейшей классификации на основании укрупненного вида, отражающего динамические принципы эволюции.

Наиболее важным новейшим методом микробиологической систематики, выработанным в последнее время иммунологией, как мы выше упомянули, является «рецепторный анализ». Биохимический метод, определение самых сложных органических соединений, входящих в состав бактериальной клетки и иммунных антисывороток, еще не исчерпывает всей характеристики микробов в направлении их взаимного сродства. Для последнего имеют большее значение те сложные группировки химических молекул, которые получили название Эрлиховских рецепторов.

Такие иммунобиологические комплексы разработаны для целей микробной систематики главным образом Уайтом и Кауфманом в форме так называемого «рецепторного анализа». Они создали наподобие химического анализа целую систему весьма тонких исследований, где изучались отдельно изолированные от ресничек тела бактерий (так называемый соматический антиген), отдельно реснички (флягеллярный антиген), далее оба компонента исследовались у бактериальных колоний различных форм (гладких — S и шероховатых — R). Все это было приведено в связь с «феноменом Эндрюса», который состоит в том, что даже одинаковые по внешнему виду бактериальные колонии могут при пересевах расщепляться на две «фазы»: специфическую, которая чувствительна к специфическим агглютининам, приготовленным по отношению к соматическому О-антигену, и неспецифическую, слабо чувствительную к специфическим агглютининам, но зато легко склеивающуюся

недифференцированными антисыворотками, приготовленными против целых бактериальных групп. В результате была создана обстоятельная классификация тифозно-паратифозных микробов при помощи весьма сложной номенклатуры, а именно: 1) группы микробов A, B, C, D, E; 2) соматические (O) антигены I, II, III, IV, V и т. д. до XIX; 3) флагеллярные антигены неспецифические 1, 2, 3, 4 и т. д.; 4) специфические. a, b, c, d и т. д. Весьма интересно, что при этом бактерии из группы A, B, C, D, E оказываются соединенными между собой общими антигенами, например Ньюпор из группы C соединен комплексом антигенов 1, 2, 3 с Бреслау, а соматическими антигенами O (VI и VII) — с паратифом C и Суипестифер. В то же время тиф соединен O-антигеном IX с Гертнером. Далее, рецепторы IX и XII, которые объединяют между собой 12 видов Сальмонелла, входят также и в тиф из рода Eberthelle и в состав рода Shigella.

Таким образом, отдельные виды оказываются соединенными между собой иммунобиологическими комплексами, и для систематика, интересующегося общими вопросами взаимного сродства бактерий в профиле теории эволюции, совершенно ясно, что все построения Уайта — Кауфмана являются сильными аргументами в пользу необходимости более крупных таксономических единиц и понятия укрупненного вида.

И именно схема Уайта — Кауфмана может сильно способствовать правильной концепции понятия о виде с его разновидностями и формами, располагающимися вокруг вида, т. е. к виду в его динамике. Общий вывод из учения Гунделя о типах и учения Уайта — Кауфмана об анализе антигенной структуры получается один и тот же, а именно: необходимость понятия об укрупненном виде. Различные комбинации O-антигенов и специфических и неспецифических флагеллярных антигенов могут служить характеристикой различных разновидностей и форм. Прибавим к тому же, что, по исследованиям американских авторов Avery и Heidelberger'a полисахаридная фракция является признаком типовой специфичности, а протеиновая — видовой. Но если распространить полисахаридную специфичность на другие микробы, например тифозно-паратифозные, то оказывается, что тифозные полисахариды имеют общие свойства с гертнеровскими, а паратифозные и полисахариды соединяются с Бреслау и т. д.

Мы должны отметить, что вопрос о специфичности, который так широко разработан в последнее время Ландштейнером, и точно так же учение о «полном антигене» Буавена скорее относятся к химической и иммунобиологической специфичности, чем к эволюционно-систематической. Здесь нужны другие методы и другие подходы, и именно со стороны эволюционного учения. Не один какой-нибудь признак, как бы важен он ни был, а только комплекс признаков может служить для характеристики вида, как его понимает биология.

Иммунобиологические комплексы раскрывают новые перспективы не только для медицинской микробиологии, но также и для общей. В последней эта сторона вопроса еще мало разработана, и ее углубление могло бы доставить дополнительные данные к тому чисто биологическому подходу, который имеет место в интересных работах о виде в микробиологии Шапошникова [7] и Кудрявцева [4]. Вместе с тем это могло бы способствовать объединению понятия о виде в общей и медицинской микробиологии. Установление общей терминологии для обеих этих дисциплин необходимо для устранения неопределенности в обоих значениях. Варианты, модификации, типы, сильтанты, мутанты, разновидности, формы — все эти термины применяются в медицинской микробиологии часто по отношению к одному и тому же объекту. В нашей литературе наибольшей определенностью отличается номенклатура Штуцера, а именно: кроме вида, он принимает еще подвид (Subspecies),

разновидность, форму или расу и морфу (по Штуцеру — не наследственная). Однако же здесь должны быть введены некоторые поправки: у Штуцера подвид, форма и морфа отнесены к разновидностям, между тем как в ботанике подвид не есть разновидность, и морфа, которая, по Штуцеру, не наследственна, тоже не может быть разновидностью, так как разновидность всегда наследственна. Но со следующей поправкой эта номенклатура для медицинской микробиологии может быть принята, а именно: вид, подвид (там, где есть необходимость разделить вид на подвиды), разновидность, форма. Форма тождественна (или весьма близка) с типом и расой. Что касается ненаследственной морфы, то она тождественна с модификацией (длительной или кратковременной) и не является таксономической единицей для систематики. Этот термин должен иметь место в области изменчивости. Термин «мутация» в медицинской микробиологии может применяться только в условном смысле, ввиду недоказанности у бактерий полового размножения. Как известно, Нейссер и Массини назвали «мутацией» образование у B. coli лактозоразлагающих колоний из лактозодефективных.

Остановимся еще несколько на вопросе об эволюции бактерий. Медицинская микробиология применила здесь весьма интересный исторический метод сравнительного изучения кишечной микрофлоры человека, других млекопитающих, затем более низко стоящих животных, например пресмыкающихся, земноводных и др. Это дает возможность ознакомиться с более примитивными представителями кишечной флоры и с ее эволюцией до кишечной флоры человека и, таким образом, рассматривать мир бактерий в исторической перспективе.

На основании всего предыдущего следует считать, что общие принципы микробиологической систематики должны быть в настоящее время построены в следующем аспекте:

1) прежде всего морфология, которая является базисом для разделения бактерий на кокки, палочки и спириллы; сюда же относится спорообразование, подвижность, отношение к окраске по Граму и др.;

2) культуральные и биохимические свойства (ферменты), патогенность и токсичность (в медицинской микробиологии);

3) серология;

4) рецепторный анализ и биохимическая структура антигенов, т. е. биохимические комплексы.

Современная классификация должна базироваться не на отдельных признаках (значение биохимического принципа часто слишком преувеличивается), а на всей совокупности, на комплексе всех вышеуказанных признаков.

Исходя из этого и опираясь на общее определение вида у В. Л. Комарова, можно дать следующее краткое определение вида в микробиологии: «Вид в микробиологии есть совокупность бактериальных поколений, происходящих от одного общего бактериального предка и борьбой за существование и путем отбора обособленных от других представителей бактерий следующим комплексом признаков: морфологических, культуральных и биохимических, серологических, и рецепторным анализом в связи с антигенной структурой; вид в микробиологии является вместе с тем этапом эволюционного процесса мира бактерий». Нам кажется, что такое определение соответствует эволюционному подходу в систематике бактерий, и на таком представлении об укрупненном виде, однако же не доходящем до Линнеона, должна производиться обработка систематического материала в области микробиологии.

Выводы

1. Современная бактериологическая систематика и в частности некоторые руководства, например Bergey, носят номенклатурный характер

и ведут к распылению видов, к слишком мелким таксономическим единицам.

2. Ни один признак сам по себе не может служить достаточным критерием для установления вида, и руководиться следует только комплексом всех признаков, а именно: морфологией, физиологическими и биохимическими признаками, иммунными реакциями (серодиагностикой). В последнее время следует подчеркнуть рецепторный анализ и антигенную структуру.

3. Микробиологическая систематика должна быть построена на основах более укрупненного вида с указанием разновидностей и форм, и дальнейшая работа должна производиться в профиле эволюционной систематики и изучения вида в его развитии и динамике в том направлении, какое указано в книге академика В. Л. Комарова о виде.

Институт микробиологии
и эпидемиологии Академии Наук УССР
и
Институт эпидемиологии и микробиологии
Киргизской ССР
Фрунзе

Получено 10. VI. 1941

ЛИТЕРАТУРА

1. Берджи. Определитель микробов, перевод с англ. Киев, 1936.
2. Вейнберг М. и Гинзбург В. Анаэробные микробы и их роль в патологии. Гос. мед. изд-во.
3. Комаров В. Л. Учение о виде у растений, Ленинград — Москва, 1940.
4. Кудрявцев В. И. О принципах классификации микроорганизмов. Микробиология, т. XI, вып. 1—2, стр. 15, 1942.
5. Минкевич. Курс санитарной бактериологии, 1940.
6. Фишер. Лекции о бактериях, перев. с нем., 1902.
7. Шапошников В. Н. О значении физиологических признаков в систематике микроорганизмов. Микробиология, т. XI, вып. 1—2, стр. 1, 1943.
8. Штуцер, Эльберт и др. Руководство по микробиологии и эпидемиологии, Москва, 1937.
9. Flügge, Handb. der Hygiene, 1908.
10. Gottschlich. Handb. d. pathogenen Mikroorganismen, Bd. I, 1927.
11. Hadley · The dissotiative Aspects of Bacterial Behavior. Chikago, 1928.
12. Lehmann u. Neumann, Atlas u. Grundriss d. Bakterien, 1926.
13. Lentz u. Prigge, Handb. d. pathogenen Mikroorganismen, 1927.
14. Migula. System der Bakterien. Jena, 1900.
15. Topley u. Wilson. The Principles of Barteriology and Immunology, 1934.
16. Issatchenko B. Dtsch. med. Wochenschr. 1914.

THE CONCEPTION OF SPECIES IN GENERAL AND MEDICAL MICROBIOLOGY

B. I. Klein

Summary

1. The contemporary biological systematics in particular some textbooks, as for instance Bergey's bear the character of a nomenclature and lead to an excessive subdivision of species, to extremely minute taxonomic units.

2. No single character can be considered by itself as a sufficient criterium for establishing a species and one should be guided only by the complex of all the characters, namely: morphology, physiological and biochemical properties, immune reactions (serological diagnostics); of late great stress has been laid on receptor analysis and antigenic structure.

3. The microbiological systematics must be built on the basis of a more enlarged species with indications regarding varieties and forms; further work should be carried on with a view to evolutionary systematics and to the investigation of the species in its development and dynamics, in conformance with the direction indicated in the work of Prof. Komarov on the species.

Institute of Microbiology and Epidemiology
of the Academy of Sciences of the Ukr. SSR and
Institute of Epidemiology and Microbiology
of the Kirghiz SSR
Frunze

ТЕРМОФИЛЬНЫЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ БАКТЕРИИ

1. ОСЛАБЛЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

С. З. Броцкая

Как известно, термофильные микроорганизмы быстро размножаются и обладают высокой биохимической активностью [1, 2]. Поэтому разработка методов выделения и изучения биологии термофильных бактерий заслуживает внимания.

Наши исследования были посвящены термофильным протеолитическим бактериям, причем оказалось, что эти организмы в лабораторных условиях утрачивали способность к протеолизу.

Потеря активности культур — явление хорошо известное в микробиологии. Ярким примером может послужить инактивация B. felsineus, молочнокислых, маслянокислых бактерий и др.

Объяснение причин, вызывающих ослабление культур, представляет интерес, так как сохранение активности микробов — одна из основных задач современной микробиологии.

Экспериментальная часть

В процессе изучения термофильных протеолитических бактерий в нашей лаборатории был выделен штамм, обладающий значительной протеолитической активностью. Однако пересевы этой культуры в течение нескольких месяцев на мясопептонном агаре привели к полной потере ее протеолитической активности.

Неоднократные пассажи культуры на мясопептонной желатине и мясопептонном бульоне с добавлением таких веществ, как дрожжевой автолизат, или 10% фекальный экстракт, не восстановили утерянной функции.

Это побудило нас приступить к выделению новых штаммов термофильных протеолитических бактерий. Подобное явление повторилось со всеми выделяемыми штаммами, так как пересевы термофилов на мясопептонном агаре или мясопептонной желатине приводили к резкому ослаблению протеолитической активности. В противоположность этому в культурах на мясопептонном бульоне активность бактерий сохранилась полностью. Эти наблюдения побудили нас заняться выяснением причин инактивации культур.

Методика

Все опыты были проведены с термофильной спороносной бактерией, выделенной из куриного помета.

Приводим краткую характеристику культуры.

Вегетативные клетки имеют форму палочек с закругленными концами, размером 1-2μ — 4-8μ. Часто они образуют короткую цепочку, состоящую из 2—3 клеток. Бактерии неподвижные, хорошо окрашиваются основными красками, грамположительные. Круглые споры имеют терминальную локализацию. На мясопептонном агаре термофильные протеолитические бактерии образуют большие, серовато-белые.

плоские, сухие, с бахромчатыми краями, колонии. На мясопептонном бульоне и на мясопептонной желатине наблюдается серовато-белая, морщинистая пленка. Мути и осадка при этом в среде нет. Разжижение мясопептонной желатины, на которой культивировался наш штамм, наступает через 12 часов. На картофеле термофильные протеолитические бактерии развиваются хорошо, не образуя пигмента.

Свертывание и пептонизация молока отсутствуют. На сусле, сусло-агаре, кровяной сыворотке термофилы не развиваются. Аммиак выделяют, сероводорода не образуют, нитриты не редуцируют. На мясопептонном бульоне с глюкозой, сахарозой, мальтозой и лактозой термофильные протеолитические бактерии развиваются хорошо, но кислот не образуют. Крахмал не гидролизуют. Температурный оптимум роста лежит в пределах 53—55°, при 22° бактерии не развиваются. Слабый рост на вторые—третьи сутки наблюдается при 37°.

Выделенный штамм, повидимому, является вариантом Bac. thermoalimentophilus, описанным Coolhaas'ом. От указанного вида наша культура незначительно отличается размером своих клеток, бахромчатым краем и матовостью колоний, а также отсутствием редукции нитратов.

Культивирование термофильных протеолитических бактерий производилось при 55° на мясопептонном бульоне (pH = 7,6—7,8) в течение 17 часов.

Перед посевом культура в пробирках тщательно взбалтывалась, и 0,1 см³ бактериальной взвеси пипеткой переносилась в свежую среду. Так как при 55° желатина становится жидкой, способность бактерий разжижать желатину устанавливалась путем охлаждения культуры, выросшей при 55°, в специально приготовленной для этой цели охлаждающей смеси. Для этого пробирки с культурой на мясопептонной желатине опускались в раствор азотнокислого аммония (1 часть соли + 1,3 части воды); в случае разжижения желатины последняя не застывает.

Активность протеиназ, образующихся в культуре бактерий, устанавливалась вискозиметрией или титрованием свободных карбоксильных групп спиртовой щелочью. По первому методу к 6 см³ 8% водной желатины добавлялось 3 см³ культуры термофилов, и после тщательного взбалтывания содержимого пробирок последние выдерживались при 60° в течение 3 часов. Затем вязкость среды определялась вискозиметром Оствальда при 30°.

Титрование свободных карбоксильных групп осуществлялось 0,05 *N* раствором спиртовой щелочи в присутствии фенолфталеина. К 1 см³ 8% водной желатины, пипеткой в колбы Эрленмейера емкостью 10 см³, прибавлялось 0,5 см³ испытуемой культуры. Колбы выдерживались при 60° в течение 3 часов. По истечении этого срока желатина, к которой была добавлена культура, титровалась щелочью. В качестве контроля служила желатина с 0,5 см³ стерильной среды.

При добавлении щелочи желатина тщательно взбалтывалась во избежание образования комков.

Протеолитическая активность термофилов после культивирования на мясопептонном агаре и желатине

С целью выяснить, как быстро утрачивается протеолитическая активность у термофильных бактерий при пассажах на мясопептонном агаре, выделенный штамм дважды пересевался; через каждые 17 часов, на 2% мясопептонном агаре. В контроле культура одновременно пересевалась на мясопептонном бульоне. Затем как из опытной, так и из контрольной пробирок был сделан отсев на 15% мясопептонную желатину. Через 17 часов на желатине можно было наблюдать мощную пленку хорошо развившихся бактерий.

Как видно из результатов, приведенных в табл. 1, достаточно было двух пассажей на 2% мясопептонном агаре, чтобы произошла почти полная потеря способности разжижать желатину.

Таблица 1

Потеря протеолитической активности при пассажах на мясопептонном агаре

Условия опыта	Время истечения желатины			Среднее
	№ опыта			
	1	2	3	
Культура с мясопептонного агара	1′58″	1′55″	1′57″	1′56″
Культура с мясопептонного бульона (1-й контроль)	0′57″	0′56″	0′58″	0′57″
15% желатина без культуры (2-й контроль)	2′ 5″	2′00″	1′00″	2′ 1″

Аналогичный опыт был поставлен с мясопептонной желатиной. Молодая культура с мясопептонного бульона была посеяна на 15% мясопептонную желатину, а затем пересевалась 4 раза на этой среде через каждые 17 часов. В контроле культура пересевалась на мясопептонном бульоне. При всех посевах на мясопептонной желатине было очень хорошее развитие бактерий, однако с каждым пассажем степень разжижения желатины уменьшалась, и после четвертого пассажа желатина при охлаждении полностью застыла. Отсутствие протеаз в среде при каждом пассаже культуры было доказано вискозиметрией.

Результаты этих опытов приведены в табл. 2. Эти данные подтвердили, что после пассажей на 15% мясопептонной желатине протеазы в среде фактически отсутствуют. В контрольных посевах на мясопептонном бульоне они неизменно обнаруживаются.

Таблица 2

Ослабление протеолиза при пассажах культуры на мясопептонной желатине

Условия опыта	Время истечения желатины			Среднее
	№ опыта			
	1	2	3	
Культура с мясопептонной желатины . . .	2′00″	1′58″	1′59″	1′59″
Культура с мясопептонного бульона (1-й контроль)	1′00″	1′00″	1′10″	1′ 3″
15% желатина без культуры (2-й контроль)	2′15′	2′15″	2′10″	2′13″

Проведенные исследования говорят о том, что для накопления протеаз термофильными протеолитическими бактериями характер питательной среды имеет существенное значение.

Чем объяснить ослабление протеолитической активности в этих опытах?

Предположение об общем ослаблении — «дегенерации» культуры отпадает, так как бактерии, теряя способность разжижать желатину, дают хороший рост. Повидимому, функция размножения в этих условиях не угнетается. Можно было думать, что либо отсутствие разжижения желатины связано с инактивацией фермента, либо протеазы вовсе не образуются на средах, не содержащих желатины (в наших опытах при посевах на мясопептонный агар). Однако этому объяснению противоречит ослабление протеолитической активности также на мясопептонной желатине. На этом субстрате не может прекратиться образование протеаз, разжижающих желатину из-за отсутствия последней. С другой стороны, на мясопептонном бульоне, не содержащем желатины, культура при посевах полностью сохраняла свою активность, что также говорит против вышеуказанных предположений.

Следовательно, все вышеприведенные гипотезы не могут объяснить нам ослабление основной функции термофильных бактерий. Видимо, ведущая роль в этом явлении принадлежит физико-химическим свойствам питательных сред.

Выяснению этого вопроса будет посвящено наше второе сообщение.

Устойчивость модификационных изменений

Интересно было проверить, как сказывается на последующих поколениях потеря термофильными бактериями протеолитической активности, т. е. насколько эти изменения устойчивы.

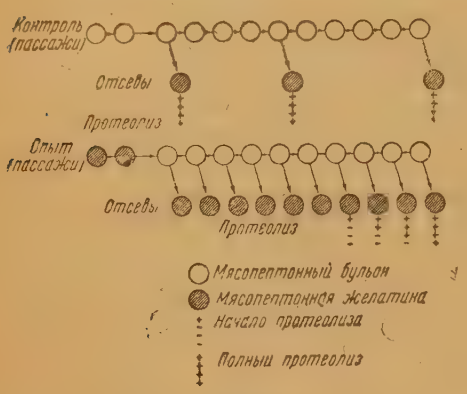


Рис. 1

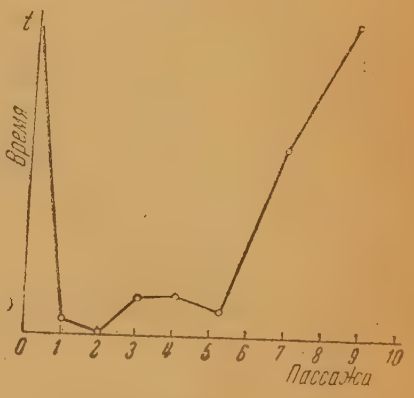


Рис. 2

С этой целью мы начали культивирование термофильных протеолитических бактерий на 15% мясопептонной желатине, а в контроле термофилы выращивались на мясопептонном бульоне.

Как уже указывалось выше, двукратные пассажи на 15% мясопептонной желатине приводят к полной потере протеолитической активности культуры.

Получив таким образом из исходной активной культуры неактивный штамм термофильных протеолитических бактерий, мы попытались восстановить его утраченную функцию ежедневными пассажами на мясопептонном бульоне.

Протеолитическая активность культуры определялась при каждом таком пересеве вискозиметрией желатины. Первоначальные пассажи термофилов на мясопептонном бульоне не восстановили их протеолитических свойств. Только на седьмом пассаже стала восстанавливаться протеолитическая активность у минус-варианта. На десятом пассаже культура снова приобрела свою первоначальную активность. Видимо, при пересевах на мясопептонном бульоне термофильные бактерии медленно восстанавливают свою утерянную функцию. Схема этого опыта указана на рис. 1.

Более наглядное представление о постепенном возврате протеолитической активности культуры дает графическое изображение на рис. 2.

На оси абсцисс отложены номера пассажей, а на ординате — время истечения (в секундах) испытуемой жидкости.

Следовательно, культивируя термофильные протеолитические бактерии на мясопептонной желатине или на мясопептонном агаре, можно легко получить длительную модификацию, утратившую способность разжижать желатину.

Что послужило причиной столь необычного явления? Сталкиваемся ли мы в данном случае с отбором отдельных особей, утративших способность к протеолизу, либо определенные условия культивирования вызывают определенные изменения?

Повидимому — последнее.

При этом небезынтересно отметить, что фактором, вызывающим эти изменения, послужили вещества, входящие в состав обычных питательных сред, именно — агар-агар и желатина. Таким образом, понятие «обычные» питательные среды весьма относительно.

Следует отметить, что описанное явление специфично для термофилов, так как у мезофильных бактерий мы не наблюдали в этих условиях ослабления протеолиза.

В заключение приношу глубокую благодарность за руководство этой работой А. А. Имшенецкому.

Выводы

1. Основное свойство термофильных протеолитических бактерий — способность вызывать протеолиз — признак не стойкий. Достаточно кратковременного культивирования их на плотных или вязких средах (например, на мясопептонном агаре или мясопептонной желатине), чтобы эти бактерии потеряли способность разжижать желатину.

2. Выращивая бактерии на мясопептонном бульоне, удается полностью сохранить их протеолитическую активность.

3. Изменения, претерпеваемые бактериями, передаются по наследству, но носят обратимый характер. После нескольких пассажей на жидких средах они восстанавливают свою протеолитическую активность.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 20. IX. 1944

ЛИТЕРАТУРА

1. Имшенецкий А. А., Биохимическая активность термофильных бактерий, ДАН, т. 30, стр. 667, 1941.
2. Имшенецкий А. А., О скорости процессов, вызываемых мезофильными и термофильными бактериями. Микробиология, т. X, вып. 4, стр. 386, 1941.

THERMOPHYLIC PROTEOLYTIC BACTERIA

1. INACTIVATION OF PROTEOLYTIC ACTIVITY

S. Z. Brockaia

Summary

1. The essential property of thermophylic proteolytic bacteria, their ability to provoke proteolysis, is an unstable characteristic. Cultivation on solid or viscous media (*e. g.* on meat peptone agar or meat peptone gelatine) for a brief period results in their losing the ability to liquefy gelatine.

2. By cultivating these bacteria in meat peptone broth it is possible to maintain their proteolytic activity unchanged.

3. The changes suffered by the bacteria are transmitted by heredity, but are reversible. After several transfers made in liquid media their proteolytic activity is restored.

Institute of Microbiology
of the Academy of Sciences of the USSR,
Moscow

ВЛИЯНИЕ ЭТИЛОВОГО СПИРТА НА ПРОЦЕСС ОКИСЛЕНИЯ СОРБИТА В СОРБОЗУ ПРИ СИНТЕЗЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

З. Г. Разумовская и *Л. Н. Белинькая*

Производственный процесс синтеза аскорбиновой кислоты (витамина С) принимает все бóльшие масштабы, и, в связи с этим, получение сорбозы биохимическим путем, как звено в этом синтезе, приобретает все большее значение. В настоящей работе мы приводим данные по вопросу о влиянии этилового спирта на процесс окисления сорбита в сорбозу Ac. melanogenum. Как показывают работы Beijerink'a [3], Waterman'a [5] и Janke [4] Ac. melanogenum обладает широкой окислительной деятельностью и способен производить окисление различных спиртов. Окисление сорбита у Ac. melanogenum, как это видно из работы Креслинга [1], протекает быстро. Постепенным приучением удается получить штаммы, способные производить окисление высоких концентраций сорбита. Производственный штамм Ac. melanogenum является активной культурой, выращиваемой постоянно на среде с 10—15% сорбита. Когда мы произвели посевы этого штамма на среду с этиловым спиртом, то оказалось, что при концентрации спирта в 1—2% наблюдается очень медленный рост и окисление спирта, а при 3% этилового спирта развития не наблюдалось. Однако, если путем последовательных пересевов со среды с этиловым спиртом переходить постепенно к повышающимся концентрациям спирта, то наблюдается энергичное окисление его. Таким образом, при постоянном культивировании Ac. melanogenum на высоких концентрациях сорбита повышается энергия его окисления и падает способность окисления этилового спирта. Как протекает процесс окисления сорбита у Ac. melanogenum в том случае, если в среде будут одновременно присутствовать и этиловый спирт и сорбит?

Для решения этого вопроса мы провели опыты в колбах со средой: 5% дрожжевого отвара и 10% сорбита.

Из сорбита, предварительной отгонкой, удалялся спирт. После стерилизации среды в ряд колб добавлялся спирт в количестве 0,5—1,0%. Заражение производилось однодневной культурой Ac. melanogenum, температура опыта 28°. На четвертый день проведено определение сорбозы по методу Бертрана. Опыт с использованием сорбита 2-го сорта дал следующие результаты (табл. 1).

Таблица 1

Влияние этилового спирта на выход сорбозы

№ колбы	Спирт в начале опыта, %	Сорбоза, %	
1	без спирта	64,7	65,13
2	» »	65,56	
3	0,5	33,8	35,9
4	0,5	38,0	
5	1,0	26,0	23,5
6	1,0	21,0	

Здесь видно, что добавление 0,5% спирта почти вдвое снижает выход сорбозы, а 1% уменьшает почти в 3 раза. Таким образом, присутствие в среде этилового спирта неблагоприятно сказывается на окислении сорбита в сорбозу.

В аналогичном опыте, с сорбитом 2-го сорта другой партии, мы уменьшили концентрации спирта и проследили последовательный ход накопления сорбозы (табл. 2).

Таблица 2

Влияние спирта на выход сорбозы

№ колбы	Спирт, %	Сорбоза, %					
		2-й день		4-й день		6-й день	
1	0,0	53,0	49,0	60,1	59,75	64,0	62,3
2	0,0	45,0		59,4		60,6	
3	0,2	2,5	33,3	45,4	44,3	49,8	49,5
4	0,2	34,2		43,2		49,2	
5	0,5	22,8	27,5	28,8	34,4	40,3	42,8
6	0,5	27,2		40,0		45,4	

В этом случае наблюдаем такое же снижение выхода сорбозы в присутствии этилового спирта, причем его влияние сказывается со 2-го дня и сохраняется до 6-го.

Результаты опытов с сорбитом 1-го сорта приведены в табл. 3.

Таблица 3

Влияние спирта на выход сорбозы

№ колбы	Спирт, %	Сорбоза, %					
		2-й день		4-й день		6-й день	
1	без спирта	86,6	79,7	86,6	82,3	86,6	85,9
2	» »	72,8		78,0		85,2	
3	0,2	62,1	62,1	74,4	74,4	81,0	81,7
4	0,2	62,1		74,4		82,4	
5	0,5	0,0	16,7	65,0	60,5	78,0	70,2
6	0,5	33,4		56,0		62,4	

На среде с сорбитом 1-го сорта различие в накоплении сорбозы, при концентрации этилового спирта 0,2%, сглаживается к 6-му дню; 0,5% спирта вызывает заметное снижение и в первые и в последующие дни. Поскольку Ac. melanogenum обладает способностью окислять тот и другой спирты, нужно было выяснить, как идет это окисление. Так как при окислении этилового спирта образуется уксусная кислота, а из сорбита — сорбоза, то мы провели учет спирта, кислотности и сорбозы.

Опыт проведен, как обычно, в колбах на среде с сорбитом 1-го сорта. Определение спирта проводилось по методу Солдатенкова (табл. 4).

Этиловый спирт быстро окисляется и на второй день не обнаруживается в среде. Параллельно с этим нарастает кислотность. Окисление сорбита идет одновременно с окислением этилового спирта, однако в присутствии последнего оно сильно задерживается в 1-й день.

Нарастание кислотности в опытах с добавлением спирта достигает уже в 1-й день 44 и 70 см³ 0,1 *N* кислоты, что соответствует около 0,3 и 0,5% уксусной кислоты и, как это видно из следующих данных, может быть причиной задержки окисления (табл. 5).

Таблица 4

Изменение этилового спирта, кислотности среды и выхода сорбозы

№ колбы	Спирт, %			Кислотность на 100 см³ среды, в 1 см³ 0,1 N кислоты						Сорбоза, %					
	исходное колич.	1-й день	2-й день	1-й день		3-й день		5-й день		1-й день		3-й день		5-й день	
1	0	—	—	12	12,5	26,0	24,5	26,0	25,0	38,5	43,3	85,78	85,45	89,82	89,49
2	0	—	—	13,0		23,0		24,0		48,24		85,12		89,16	
3	0,2	0,0	0,0	42,0	44,0	50,0	52,0	48,0	48,0	13,68	15,73	50,82	65,27	69,84	73,79
4	0,2	0,0	0,0	45,0		54,0		48,0		17,79		79,72		77,75	
5	0,5	0,112	0,0	73,0	70,5	100,0	94,0	96,0	100,0	10,27	9,47	45,62	43,01	64,56	61,27
		0,114													
6	0,5	0,117	0,0	68,0		88,0		104,0		8,66		40,40		57,99	

Таблица 5

Влияние уксусной кислоты на выход сорбозы

№ колбы	Исходная кислотность на 100 см³ среды, в 1 см³ 0,1 N кислоты	Сорбоза, %			
		2-й день		5-й день	
1	2,4	78,41	83,11	89,15	89,8
2	2,45	87,81		90,45	
3	43,0	37,86	37,22	71,22	70,18
4	43,0	36,59		69,14	
5	75,6	следы		41,58	48,29
6	75,6	»		52,00	

Микроскопические наблюдения по ходу опытов показывают, что в опытах с этиловым спиртом встречаются характерные, так называемые «инволюционные формы» уксуснокислых бактерий. Их больше там, где больше процент спирта, и их нет в контрольных колбах. В опытах с добавлением уксусной кислоты их не наблюдалось, и, видимо, они связаны с наличием этилового спирта в среде.

Таким образом, лабораторные опыты показывают, что этиловый спирт, даже в небольших концентрациях, вызывает у Ac. melanogenum замедление процесса окисления сорбита и снижение общего выхода, которое сильнее выражено на сорбите 2-го сорта. (По ходу производственного процесса окисления сорбита спирт вносится двумя путями — вместе с сорбитом и во время «стерилизации» кювет).

Количество спирта в сорбите, как это видно из следующих данных, может быть различным (табл. 6).

Таблица 6

Количество этилового спирта в сорбите 1-го и 2-го сортов

Сорт	№ образца сорбита	Спирт, %
1-й	1	Следы
	2	»
	3	»
2-й	4	2,33
	5	2,59
	6	4,73
	7	5,42
	8	6,74
	9	7,33
	10	8,16
	11	8,17

В трех пробах сорбита 1-го сорта этилового спирта нет, а в сорбите 2-го сорта процент колеблется от 2,33 до 8,17.

«Стерилизация», или, вернее, промывание кювет этиловым спиртом, оставляет большее или меньшее его количество в зависимости от налитого в кювету спирта, его концентрации и степени подсушивания кюветы.

В связи с этим количество спирта в питательной среде, разлитой в кюветы, будет в отдельных случаях различным (табл. 7).

Таблица 7

Содержание спирта в производственных кюветах в момент загрузки

№ пробы	Спирт (%) в кюветах		
	1	2	3
1	0,624	0,641	0,571
2	0,89	0,89	0,89
3	0,25	0,27	—
4	0,55	0,50	—

В кюветах одновременной загрузки колебания незначительны, но в отдельных пробах они в тех же пределах, что и в образцах сорбита. (Производственная среда та же — 5% дрожжевой воды и 10—15% сорбита).

Изменение характера окисления наблюдалось в производственных кюветах одной загрузки, но с разным количеством этилового спирта (табл. 8).

Таблица 8

Выход сорбозы в производственных кюветах на 3-й день. Сорбит 1-го сорта

№ кюветы	Исходное количество этилового спирта в среде, %	Сорбоза, %
1	0,55	39,09
2	0,50	56,51
3	0,27	87,58
4	0,25	84,57

Здесь видна значительная разница в выходах сорбозы. Наблюдения за последовательным изменением этилового спирта, кислотностью среды и количеством сорбозы, проведенные по ходу производственного процесса, дали результаты, приведенные в табл. 9.

Таблица 9

Изменение количества этилового спирта, кислотности и выход сорбозы в производственных кюветах

№ кюветы	Этиловый спирт, %			Кислотность на 100 см³ среды, в 1 см³ 0,1 *N* кислоты				Сорбоза, %
	исходное	1-й день	4-й день	исходное	1-й день	4-й день	5-й день	5-й день
1	0,89	0,066	0,0	18,19	231,2	173,3	80,2	56,0
2	0,89	0,174	0,0	18,19	196,9	17,2	16,05	68,0
3	0,89	0,214	0,0	18,19	194,7	258,9	379,8	71,0

Изменения этилового спирта, кислотности

№ кюветы	Спирт, %		Кислотность на 100 см³ среды, в см³ 0,1 N			
	исходное	1-й день	исходное	1-й день	2-й день	3-й день
1	0	0	5,6	18,2 } 17,5	28,0 } 27,3	30,8 } 30,8
2	0	0	5,6	16,8 }	26,6 }	30,8 }
3	0,2	0,0	5,6	44,8 } 44,8	53,2 } 53,9	60,2 } 53,2
4	0,2	0,0	5,6	44,8 }	54,6 }	46,2 }
5	0,34	следы	5,6	35,0 } 28,0	46,2 } 39,2	54,6 } 44,8
6	0,30	»	5,6	21,0 }	32,2 }	35,0 }

Наблюдается окисление этилового спирта, количество его уменьшается и к 4-му дню его нет в среде — кислотность же среды нарастает. Однако в производственных кюветах мы не наблюдаем соотношения в количестве спирта и нарастании кислотности. Последняя довольно равномерно изменилась в 1-й день, а на 4-й и 5-й дни мы видим в одной кювете последующее повышение и в двух других спад кислотности, причем идет он не одинаково в этих двух случаях. Выход сорбозы, определенный на 5-й день, также не дает закономерности.

Микроскопическое наблюдение за этими кюветами показало, что в производственных кюветах находится многочисленная и разнообразная микрофлора. Наши обследования [2] показали, что производственный процесс протекает не в чистой культуре, а в присутствии многочисленной посторонней микрофлоры, различной физиологически. Эта сопутствующая микрофлора обладает различными окислительными способностями и вызывает различие в накоплении кислотности в среде; таким образом, здесь не сохраняется четкое соотношение между этиловым спиртом, кислотностью и выходом сорбозы.

Мы поставили специальный опыт на заводе. Опытные кюветы и стекла, закрывающие их перед загрузкой, не обмывались спиртом, а прогревались паром через шланг, включенный в паровую сеть завода. Две кюветы были контрольными (1—2), в две другие добавлен этиловый спирт в количестве 0,2% (3—4). Сорбит 1-го сорта не содержал спирта. Производственные кюветы 5—6 были снаряжены, как обычно, с промыванием кювет спиртом.

Микроскопический контроль показал, что со 2-го дня появилась сопутствующая микрофлора во всех кюветах: в наибольшем количестве — в производственных кюветах 5 и 6, меньше всего — в кюветах 1 и 2. Последние дают самый большой выход сорбозы. Добавление 0,2% этилового спирта почти не сказалось на выходе сорбозы, но все же он ниже, чем в кюветах без спирта, где вообще очень большая однородность данных в двух параллельных. Этиловый спирт, как это было и в других опытах, используется быстро: ко 2-му дню его не остается в среде, кислотность же не сохраняет нарастания до конца опыта и падает к 4-му дню.

Этот ориентировочный опыт на заводе дает возможность считать, что пропаривание кювет не ухудшает, а улучшает течение процесса и может быть рекомендовано для производства.

Выводы

В чистой культуре Ac. melanogenum добавление этилового спирта в количестве 1, 0,5 и 0,2% в среду с дрожжевой водой и сорбитом вызывает снижение выхода сорбозы, наиболее резкое при концентрации

Таблица 10

и выход сорбозы в производственных опытах

кислоты	Сорбоза, %			
4-й день	1-й день	2-й день	3-й день	4-й день
10,5 } 10,5 10,5 }	33,02 } 33,45 33,88 }	88,96 } 89,42 89,88 }	98,3 } 99,45 100,6 }	95,94 } 96,40 96,86 }
25,2 } 19,6 14,0 }	30,42 } 31,28 32,15 }	83,88 } 85,72 87,57 }	95,00 } 94,5 94,05 }	92,65 } 93,57 94,53 }
— —	22,69 } 23,1 23,53 }	72,04 } 74,73 77,47 }	83,42 } 86,19 88,96 }	87,0 } 88,0 89,0 }

в 1%, когда получается уменьшение сорбозы почти в три раза по сравнению с контролем. Концентрации 0,5 и 0,2% этилового спирта дают снижение более резкое, выраженное при использовании сорбита 2-го сорта.

Окисление этилового спирта и сорбита в уксусную кислоту идет одновременно. Но при наличии этилового спирта происходит наиболее резкая задержка окисления сорбита в первые дни, когда используется этиловый спирт.

Добавление к сорбитной среде уксусной кислоты в количестве, какое получается из этилового спирта в первые дни при его окислении, т. е. в пределах 0,3 и 0,5%, вызывает задержку накопления сорбозы, особенно резкое в первые дни. Это объясняет наблюдавшееся на заводе отставание в накоплении сорбоз при подкислении среды уксусной кислотой, применяемой для предотвращения заражения. Главным источником этилового спирта в среде, в производственных условиях, является спирт, которого обычно в сорбите 1-го сорта почти нет, а во 2-м сорте — от 2,33 до 9,4%. Кроме того, спирт попадает в среду при промывании им кювет перед загрузкой.

В связи с наличием разнообразной посторонней микрофлоры точного сооношения между окислением спирта, накоплением кислоты и выходом сорбозы в производственных кюветах не наблюдается.

В качестве меры частичной стерилизации, вместо промывания этиловым спиртом, может быть с успехом использовано на заводе пропаривание кювет.

При больших размерах производства это дает значительный экономический эффект и выравнивает течение процесса окисления.

Необходимо учитывать отрицательное влияние этилового спирта на ход окисления сорбита и использовать сорбит, достаточно хорошо подсушенный и освобожденный от спирта, поставив это условие в стандарт на сорбит, подступающий для окисления.

Микробиологическая лаборатория
Ленинградского университета

Получено 12. V. 1941

ЛИТЕРАТУРА

1. Креслинг Е. К. Окисление сорбита при помощи микроорганизмов. Микробиология, т. VI, вып. 7, стр. 893, 1937.
2. Разумовская З. Г. Обследование микрофлоры кювет при окислении сорбита в сорбозу (в печати).
3. Beijerink M. Ueber Pigmentbildung bei Essigbakterien. Cbl. f. Bakt., Abt. II, 29, 169, 1911.
4. Janke A. Forschungsergebnisse auf dem Gebiete der Essigbakteriologie. Cbl. f. Bakt., Abt. II, 53, 81, 1921.
5. Waterman H. Zur Physiologie der Essigbakterien. Cbl. f. Bakt., Abt. II, 38, 451, 1913.

INFLUENCE OF ETHYL ALCOHOL ON THE OXIDATION OF SORBITE INTO SORBOSE IN THE SYNTHESIS OF ASCORBIC ACID

Z. G. Razumovskaya and *L. N. Belinkaya*

Summary

In a pure culture of Ac. melanogenum the addition of ethyl alcohol amounting to 1, 0,5 and 0,2 per cent into a medium containing yeast water and sorbite reduces the outlet of sorbose, especially when the concentration is 1% then the quantity of sorbose is reduced three times as compared with the control. 0,5 and 0,2 per cent concentrations of ethyl alcohol give a reduction much more pronounced when second rate sorbite is used.

The oxidation of ethyl alcohol and sorbite into acetic acid takes place simultaneously but in the presence of ethyl alcohol an especially marked delay in sorbite oxidation occurs during the first days when ethyl alcohol is used.

The addition of acetic acid to the sorbite medium in a quantity obtained from ethyl alcohol in the first days of its oxidation *i. e.* amounting to 0,3 and 0,5 per cent, produces a delay in sorbose accumulation during these days. This fact explains the delay in sorbose accumulation observed at the plant when the medium was acidified by acetic acid used in order to avoid infection.

The principal source of ethyl alcohol in the medium, in conditions of production, is alcohol which usually is almost lacking in first rate sorbite, whereas in second rate sorbite it may be found in an amount of 2,33 to 9,4 per cent. Moreover alcohol gets into the medium when the cuvette is being washed out with alcohol before filling.

In connection with the presence of a various strange microflora no definite relation of alcohol oxidation to acid accumulation and sorbose outlet in factory cuvettes can be established.

Steaming of cuvettes may be successfully used at the plant as a measure of partial sterilization instead of washing them out with ethyl alcohol. In large scale production it has a considerable economic effect and levels the course of the oxidation.

It is necessary to consider the negative influence of ethyl alcohol on the oxidation of sorbite and to use sorbite well-dried and freed from alcohol, making it a standard rule for sorbite accepted for oxidation.

The Microbiological Laboratory of the
Leningrad State University

МЕХАНИЗМ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ДЕНИТРИФИКАЦИИ

О. И. Корочкина

Известно еще из работ Gayon и Dupetit [9], что денитрификаторы при культивировании на субстратах, не содержащих азотнокислых солей, ведут себя как типичные аэробы, развиваясь в виде пленки на поверхности среды. На средах с нитратами потребность в кислороде не проявляется. Многие авторы, как Ehrenberg [1887], Burri и Stutzer [7], Weissenberg [15], Jensen [10, 11], van Iterson [13], утверждали, что денитрификация осуществима только в анаэробных условиях. Наша работа [1] показала обратное: относительно высокие окислительно-восстановительные условия $rH_2 = 24—25$ не исключают денитрификации Bact. denitrofluorescens, причем потенциал среды зависит от источника углерода. Корсакова [5] также говорит о возможности денитрификации в аэробных условиях и при этом отмечает, что в аэробных условиях протекание этого процесса требует большего избытка органического вещества по сравнению с тем, который требуется по норме, так как при аэрации денитрификаторы активируют два окислительно-восстановительных процесса, из которых процесс дыхания активируется энергичнее, чем процесс восстановления нитратов.

Все эти вопросы заставили нас, с одной стороны, ближе подойти к изучению дыхательной системы денитрификаторов и установить зависимость окисления органического вещества от его химической структуры в процессе денитрификации. Работы Корсаковой [2, 3, 4] и Aubel [6] были посвящены изучению окисления органического вещества косвенными денитрификаторами группы Bact. coli. Корсакова указывает на образование муравьиной и уксусной кислот из лимоннокислого натрия. Аубель показал, что Bact. coli может восстанавливать нитриты в аммиак в анаэробных условиях на среде с глюкозой в качестве донатора водорода. Из глюкозы при этом образуется пировиноградная кислота.

Методика определения окислительно-восстановительного потенциала, pH нитратов и нитритов нами уже была описана [1].

Молочная кислота определялась по Friedeman, Cotonio и Shaffer'y [8]. Принцип метода заключается в том, что ацетоальдегид, образующийся при окислении молочной кислоты перманганатом калия в кипящем, слабо подкисленном растворе, отгоняется, по мере их образования, в раствор бисульфита калия и там уже определяется косвенным методом иодометрического титрования. Определение летучих кислот производилось по Виртанену и Пульки с фосфорнокислым натрием.

Муравьиная кислота количественно определялась по методу Уткина и Финкс. Принцип этого метода основан на образовании каломели.

Кальций учитывался методом осаждения щавелевокислым аммонием и оттитровыванием последнего 0,01% перманганатом.

Пировиноградная кислота определялась колориметрически с нитропрусидом натрия.

Исходной культурой служила культура Bact. denitrofluorescens, которая поддерживалась на среде следующего состава: KNO_3 — 0,2%, K_2HPO_4 — 0,05%, $MgSO_4$ — 0,05% и лимоннокислый кальций 1%.

Влияние KCN на дыхательную систему денитрификаторов

Ряд работ показывает, что дыхательная система различна у различных бактерий. Так, например, у одних бактерий диффундирующий внутри клетки молекулярный кислород реагирует непосредственно с донатором водорода, у других процесс дыхания осуществляется через цитохром, у третьих — через дыхательный пигмент (Seizoburo Yomoguteni [12]).

Результаты, полученные в последнее десятилетие о влиянии синильной кислоты на дыхание микроорганизмов, заставили нас испытать его действие на дыхательную систему Bact. denitrofluorescens.

Опыты проводились в эрленмейеровских колбах при широком доступе воздуха на среде следующего состава: KNO_3 — 0,1%, K_2HPO_4 — 0,05%, $gMSO_4$ — 0,05% и лимонная кислота — 1,5%. Среда нейтрализовалась до слабощелочной реакции 10% раствором KOH.

Цианистый калий был добавлен к простерилизованной среде в следующих концентрациях: 0,0001%; 0,0002%; 0,0004% и 0,0006%. Раствор цианистого калия подвергался холодной стерилизации через свечу Шамберлена.

Засев производился 1 $см^3$ культуры Bact. denitrofluorescens с жидкой среды. Ежедневно определялся окислительно-восстановительный потенциал pH, а также учитывался ход процесса денитрификации по наличию в среде нитратов и нитритов. Данные этого опыта показали: 1) 0,0001% KCN задержал процесс на два дня; 2) 0,0002% KCN и выше вызвал сильное отставание процесса: отсутствие газообразования и накопление в среде нитритов.

Результаты опытов приведены в табл. 1. Они согласуются с данными, полученными нами в опытах, проведенных в атмосфере водорода. Это позволяет предположить, что Bact. denitrofluorescens обладает нормальной системой дыхания, на кислородную стадию которой оказывают токсическое действие цианистый калий и водород, в результате чего и происходит накопление нитритов как продукта анаэробного распада нитратов. Эти опыты подтверждают и работы Yamagata [14]. Активность выделенной им нитратредуктазы у Bact. pyocyaneum сильно задерживалась цианистым калием (табл. 1).

Таблица 1

Влияние KCN на денитрификацию

Время определения, час.	pH	Eh, вольт	rH_2	NO_2 в мг азота на 100 $см^3$	NO_3 в мг азота на 100 $см^3$
			0,0001% KCN		
0,5	7,4	0,5346	33,1	—	—
22	7,4	0,4471	30,2	следы	—
46	7,8	0,3317	27,0	»	7,5
70	8,0	0,2756	25,5	0,035	7,0
94	8,4	0,2303	27,7	0,45	4,5
142	9,0	0,2536	26,7	нет	нет
166	9,1	0,4748	34,3	»	»
			0,0002% KCN		
0,5	7,4	0,5722	32,4	—	—
22	7,5	0,4338	30,0	0,03	—
46	7,7	0,3891	28,8	0,03	7,5
70	7,8	0,3127	26,3	0,04	3,8
94	8,0	0,2998	26,0	0,05	2,25
142	8,7	0,2440	25,0	0,1	2,0
166	8,8	0,2248	25,3	0,3	0,5
190	9,1	0,2117	25,7	нет	нет

Контроль					
0,5	7,4	0,4130	29,0	—	—
22	8,2	0,3178	27,3	0,37	не измен.
46	8,9	0,2197	25,3	0,42	»
70	9,1	0,2873	28,0	нет	нет
0,0004% KCN					
0,5	7,8	0,3912	29,1	—	—
22	7,9	0,2588	24,7	0,18	12,5
46	8,0	0,2940	26,1	0,25	7,8
70	8,1	0,2935	26,3	0,26	6,4
94	8,2	0,2886	26,3	0,28	5,5
142	8,3	0,2876	26,5	0,75	2,4
166	8,4	0,2468	25,2	1,3	1,3
190	9,0	0,2158	25,4	5,0	нет
214	9,2	0,3760	31,2	нет	»

В предыдущей работе мы показали зависимость окислительно-восстановительного потенциала от источника углерода. В дальнейшем надо было установить зависимость окисляемого органического вещества от акцептора водорода. В качестве органического вещества нами была взята молочная кислота, а в качестве источника кислорода — нитраты и нитриты. Питательная среда: $CaNO_3$ или KNO_2 — 0,05%, K_2HPO_4 — 0,05% и 0,1% молочной кислоты.

Данные опыта сведены в таблицу. Они показывают, что окислительно-восстановительный потенциал на среде, содержащей азотнокислый кальций, сильно падает: с $rH_2 = 34{,}2$ до $rH_2 = 15{,}1$ (табл. 2) и далее в течение всего процесса держится на уровне $rH_2 = 15—18{,}9$. На среде с нитритами первоначального падения потенциала не наблюдалось. Потенциал в течение всего опыта был высокий: $rH_2 = 31—32$, и только в конце опыта было установлено незначительное падение потенциала до $rH_2 = 23$. Молочная кислота не была полностью использована. В среде, содержащей азотнокислый Са, молочной кислоты осталось 50 мг/л, а в среде с азотистокислым калием 36 мг/л. Определение общей кислотности заставило сделать предположение о том, что и потребленная молочная кислота не была полностью окислена до CO_2 и H_2O. Коэффициенты перегонки летучих кислот указывали на образование из молочной кислоты уксусной в количестве 206,4 мг/л. Результаты опытов приведены в табл. 2.

Таблица 2

Время определения	Опыт с нитратами					Опыт с нитритами				
	pH	Eh, вольт	NO_3, мг N_2/л	NO_2, мг N_2/л	молочная кислота, мг/л	pH	Eh, вольт	rH_2	NO_2, мг N_2/л	молочная кислота, мг/л
13/X	7,1	0,5807	34,2	—	982,5	7,1	0,5957	34,7	—	982,5
14/X	7,1	0,0275	15,1	36,5		7,1	0,5667	33,7	—	
15/X	7,1	0,0627	16,3	27,6		7,2	0,5377	32,9	—	
16/X	7,4	0,1207	18,9	24,3		7,2	0,4967	31,5	—	
17/X	7,6	0,0977	15,5	13,6		7,8	0,4769	32,0	—	
19/X	8,0	0,0307	15,0	следы		7,9	0,2927	25,8	—	
21/X	8,6	0,0428	15,8	нет	50	8,4	0,1946	23,4	газообр.	36,0

В результате анализа полученных данных был поставлен вопрос о промежуточных продуктах окисления молочной кислоты. Нами была проведена серия опытов с различными дозами молочной кислоты при

одном и том же количестве нитратов и с различными дозами нитратов при одном и том же содержании молочной кислоты.

Опыты проводились на среде следующего состава: KNO_3 — 0,05%, K_2HPO_4 — 0,05%; молочная кислота в виде кальциевых солей в следующих концентрациях: 0,05%; 0,1%; 0,2%. Над средой на 1 см высотой наливалось стерильное вазелиновое масло, чтобы задержать доступ воздуха в среду.

Таблица 3

pH	Молочная кислота, мг/л	NO_3, мг N_2/л	Коэфф. перегонки I фракции	Коэфф. перегонки II фракции	pH	Молочная кислота, мг/л	NO_3, мг N_2/л	Коэфф. перегонки I фракции	Коэфф. перегонки II фракции	pH	Молочная кислота, мг/л	NO_3, мг N_2/л
7,4	630	69,5	—	—	7,3	922,5	69,5	—	—	7,2	1 650	69,5
7,9	↓	24,5	—	—	7,9	↓	23,0	—	—	7,7	↓	24,3
8,0	315	следы	11,4	32,8	8,0	540	нет	15,7	40,0	7,9	981	нет

Результаты опыта приведены в табл. 3; они показывают, что молочная кислота во всех трех случаях не была полностью потреблена. В опытах с 0,05% молочной кислоты было потреблено 50% молочной кислоты, в опытах с большей концентрацией — 42%. Нитраты были полностью восстановлены как в первом, так и во втором случаях. Коэффициенты перегонки летучих кислот указывали на образование уксусной и муравьиной кислот. Однако количественное определение последней не дало положительных результатов. Было обнаружено только 34 мг/л муравьиной кислоты, и потому нельзя было сделать заключение о том, что муравьиная кислота является промежуточным продуктом окисления молочной кислоты.

Так как взятого нами в опыте количества нитратов оказалось недостаточно для полного окисления молочной кислоты, мы провели опыты с увеличенными концентрациями нитратов: 0,2%; 0,05%; 1% и 1,2% KNO_3. Поверхность среды, как и в предыдущем опыте, заливалась вазелиновым маслом на высоту 1 см. Опыт продолжался 10 дней.

Таблица 4

Опыты с различными дозами нитратов

pH	Молочная кислота, мг/л		Нитраты, мг/л		O_2 в мг/л на 1 г окисл. вещества		Коэфф. перегонки, %		KNO_3, %
	внесено и осталось	потреблено	внесено и осталось	потреблено	необходимый	потребленный	I фракция	II фракция	
7,4 ↓ 8,0	1 530 ↓ 517,5	1 012,5	69,3 ↓ нет	69,3	1 066	229	11,3	30,6	0,2
7,4 ↓ 8,0	1 530 ↓ 508,5	1 021,5	138,7 ↓ нет	138,7	1 066	395	16,3	32,1	0,5
7,1 ↓ 7,7	1 530 ↓ 337,5	1 192,5	277,5 ↓ 56	221,5	1 066	340,5			1
7,4 ↓ 8,0	1 530 ↓ 225	1 305	416,5 ↓ 100,8	315,7	1 066	292	15,0	31,6	1,2

Полученные результаты приведены в табл. 4. Они показывают, что потребление молочной кислоты происходит пропорционально восстанов-

ленным нитратам, т. е. чем больше первоначальная концентрация нитратов, тем больше окислено молочной кислоты. В опытах с 0,2% и 0,5% нитратов последние были почти полностью восстановлены до газообразного азота. Нитриты были обнаружены в незначительном количестве. В опытах с большей концентрацией (1% и 1,2%) мы имели значительные количества не восстановленного азота как в форме нитрата, так и в форме нитритов.

Кислородный баланс показывал, что кислород, который потреблен в результате восстановления нитратов и нитритов, недостаточен для полного окисления до CO_2 и H_2O потребленной молочной кислоты. Отсюда было сделано предположение, что молочная кислота окислена только до промежуточного соединения. При определении летучих кислот полученные коэффициенты перегонки указывали на наличие 90% от общей кислотности муравьиной кислоты, что составляет 2,48 мг/л, и 10% от общей кислотности уксусной кислоты, что соответствует 36 мг/л. В опыте с 1% и 1,2% нитратов коэффициенты перегонки были очень близки к коэффициентам перегонки уксусной кислоты.

В предыдущих опытах невысокий слой вазелинового масла (1 см) мог не задержать свободного доступа воздуха в среду, и кислород мог принимать участие в окислении молочной кислоты. Поэтому мы провели дополнительные опыты в круглых высокогорлых колбах объемом 500 см³. Среда наливалась до горла колбы, а после засева заливалась стерильным вазелиновым маслом слоем высотой 5—6 см. В качестве органического вещества были взяты молочная, пировиноградная и пропионовая кислоты [1] в количестве 0,2%; KNO_3 был взят в количестве 0,2%, но для среды с молочнокислым Ca — 0,2%, 0,6%, 1,25%, кроме того, при этом источнике углевода был взят вариант с 1,2% KNO_2. Опыты продолжались 23 дня. Результаты приведены в табл. 5 и 6.

Окислительно-восстановительный потенциал в среде с молочной кислотой на второй день после засева падает с $rH_2 = 34$ до $rH_2 = 20{,}4$. На средах с пировиноградной и пропионовой кислотами это падение потенциала не удалось установить.

В среде с молочной кислотой в конце опыта имели вторичное падение потенциала до $rH_2 = 16{,}7$. В среде с пировиноградной кислотой в конце опыта было более резкое падение потенциала $rH_2 = 1{,}0$. В среде с пропионовой кислотой не наблюдалось и вторичного падения потенциала.

Молочная и пропионовая кислоты не были использованы полностью, пировиноградная была почти полностью потреблена.

Нитраты были восстановлены до N_2 в средах, где содержание KNO_3 не превышало 0,2%; в средах с содержанием 0,6% и 1,25% KNO_3 азот остался как в форме нитратов, так и в форме нитритов.

Данные, полученные при расчете на кислород, показали, что на средах, содержащих 0,2% KNO_3, употреблено кислорода значительно меньше, чем его требовалось для полного окисления имеющихся кислот до CO_2 и H_2O. В среде с 1,25% KNO_3 кислорода потреблено больше, чем его нужно для полного окисления исчезнувшей молочной кислоты. Отсюда можно сделать предположение о неполном восстановлении нитратов. В этом случае возможно накопление промежуточного продукта типа закиси азота.

Коэффициенты перегонки указывают на присутствие в среде кислот муравьиной и уксусной. При расчете было найдено в опыте с пировиноградной кислотой до 335 мг уксусной кислоты на литр.

В среде с нитратами при данных условиях процесс денитрификации даже не начался.

[1] При анализе кислот оказалось, что они состояли из смеси уксусной и пропионовой кислот.

Таблица 5

Опыты с молочной, пировиноградной и пропионовой кислотами

Кислоты	Дата определения	pH	Eh, вольт	rH$_2$	Кислота, мг/л		NO_3, мг/л		O_2 в г на 1 г потребленного вещества		Коэфф. перегонки, %
					внесено и осталось	потреблено	внесено и осталось	потреблено	необходимо	потреблено	I фракция
Молочная	4/II	7,0	0,5885	34,0	1 145		1 200				
	5/II	7,1	0,1753	20,4							
	7/II	7,3	0,1516	19,8							
	8/II	7,5	0,1742	21,0		924,5		1 200	1 200	1,065	0,994
	10/II	7,7	0,1949	22,1							
	13/II	7,9	0,2159	23,1							
	27/II	8,7	0,0218	16,7	220,5		нет				13,3
Пировиноградная	4/II	7,4	0,5395	33,4	2 000		1 200				
	5/II	7,5	0,3837	28,0							
	7/II	7,5	0,3284	26,1							
	8/II	7,5	0,2731	24,4		1 955		1 200	0,908	0,472	
	10/II	7,6	0,2086	22,1							
	13/II	7,6	0,0918	18,3							
	27/II	7,6	0,4145	1,0	45		нет				16,9
Пропионовая	4/II	7,8	0,5455	34,4	1 826		1 200				
	5/II	7,8	0,4161	29,9	+174 укс.						
	7/II	8,2	0,3739	29,2							
	8/II	8,4	0,3549	29,0		627,2+		1 200	1,720	1,333	
	10/II	8,8	0,3206	28,6		66 укс.					
	13/II	9,0	0,2408	26,3	1 198,8						
	27/II	9,2	0,1516	23,6	+108 укс.		нет				28,8

Чтобы установить промежуточные продукты окисления органического вещества, мы поставили опыты с глюкозой, левулезой и глицерином. Питательная среда наливалась в высокогорлые колбы объемом на 500 см³, а сверху после посева наливалось стерильное вазелиновое масло слоем высотой 5—6 см. $CaCO_3$ был добавлен в количестве 1—2 г на колбу. Посев производился 1 см³ суспензией, приготовленной из 24-часовой агаровой культуры Bact. denitrofluorescens. В опытах с глицерином процесс денитрификации начался только после того, как было добавлено 50 мг глюкозы. Результаты опыта приведены в табл. 7. Во всех случаях в том или ином количестве образовался ацетоальдегид, причем в опыте с глицерином больше, чем в опыте с сахарами. В средах с сахарами в присутствии $CaCO_3$ была обнаружена щавелевая кис-

Таблица 6

Опыты с 0,6 и 1,25% нитратов

KNO_3, %	Дата определения	pH	Молочная кислота, мг/л		NO_3, мг/л		O_2 в г на 1 г окисл. вещества		Коэфф. перегонки, %	
			внесено и осталось	потреблено	внесено и осталось	потреблено	внесено и осталось	потреблено	I фракция	II фракция
0,6	4/II	7,2	1 145,0	956	2 061,9	1 293,8	1,065	0,988		
	↓	↓	↓		↓				17,5	36,5
	27/II	8,1	189,0		768,1					
1,25	4/II	7,1	1 145,0	744,5	3 716,8	2 004,5	1,065	1,881		
	↓	↓	↓		↓				23,3	36,6
	27/II	8,0	400,5		1 712,9					

лота. И во всех трех случаях в качестве летучих кислот были найдены муравьиная и уксусная кислоты.

Таблица 7

Опыты с глюкозой, левулезой и глицерином

Органическое вещество	Органич. вещество, г/л		NO_2, г/л		Щавелевая кислота, мг/л	Ацетоальдегид, мг/л	Летучие кислоты в см³ 0,1 *N*/л	
	внесено и осталось	потреблено	внесено и осталось	потреблено			муравьиная	уксусная
Глюкоза	10 ↓ 6,25	3,75	4,42 ↓ 2,16	2,26	26,25	62,04	84	156
Левулоза	10 ↓ 2,5	7,5	3,07 ↓ 0,0	3,07	45,0	33,2	48	72
Глицерин	10 ↓ 3,48	6,52	3,07 ↓ 0,0	3,07	не определялось	96,8	130	70

Выводы

Bact. denitrofluorescens обладает нормальной дыхательной системой, которая может подавляться синильной кислотой. Bact. denitrofluorescens является сильным окислителем и превращает органические кислоты (молочную, пировиноградную и пропионовую) в CO_2 и H_2O. Установить промежуточные продукты окисления трудно. Ими, повидимому, являются уксусная и муравьиная кислоты.

Возможно, что промежуточным продуктом перед появлением уксусной кислоты является и ацетоальдегид, который был обнаружен в большом количестве на средах, где в качестве органического вещества были взяты глюкоза, фруктоза и глицерин.

В заключение приношу глубокую благодарность В. Н. Шапошникову за руководство работой.

Лаборатория микробиологии
Московского
государственного университета

Получено 5. VI. 1941

ЛИТЕРАТУРА

1. Корочкина О. И. Окислительно-восстановительный режим денитрификации. Микробиология, т. V, вып. 5, 1936.
2. Корсакова М. П. Химизм процесса денитрификации, Изв. Акад. Наук СССР, 1929.
3. Корсакова М. П. Восстановление нитратов как окислительно-востановительный процесс. Успехи биол. химии, вып. 10, 1934.
4. Корсакова М. П. и Лопатина. Механизм восстановления нитратов. Изв. Акад. Наук СССР, 1929.
5. Корсакова М. П. Влияние аэрации на процесс восстановления нитратов. Микробиология, т. X, вып. 2, 1941.
6. Aubel E. Sur la réduction des nitrites par Bact. coli, C. R. Soc. Biol., Paris, 28, 1938.
7. Burri R. u. Stutzer A. Ueber nitratzerstörende Bakterien und den durch dieselben bedingten Stickstoffverlust, Cbl. f. Bact., 2, 1, 1895.
8. Frideman, Margherita Cotonio u. Shaffer, The determination of lactic acid. J. Biol. Chem., v. 73, 1927.
9. Gayon et Dupetit, Sur la transtormation des nitrates. C. R. Acad. Sci. Paris, 95, 1882.
10. Jensen H. Beitr. zur Morphologie u. Biologie der Denitrifikationsbakterien, Cbl. f. Bakt., II Abt., Bd. 4, 1898.

11. Jensen H. Das Verhältnis der denitrifizierenden Bakterien zu einigen kohlenstoffverbindungen, Cbl. f. Bakt., II. Abt. 1897.
12. Seizoburo Yomoguteni. Ueber die Beeinflussung der Sauerstoffatmung von verschiedenen Bakterien durch Blausäure u. Kohlenoxyd. Acta Phytochimica, VIII, Nr. 1, 1934.
13. van Iterson, Anhäufungsversuche mit denitrifizierenden Bakterien. Cbl. f. Bakt., II. Abt., 12, 1904.
14. von Synuz Yomogata. Ueber die Nitratreduktasa und die Nitritreduktasa eines neuen Enzym von Bact. pyocyaneus. Acta Phytochimica, VIII, 1902.
15. Weissenberg H. Ueber die Denitritifikation. Cbl. f. Bakt. Bd. VIII, 1902.

THE MECHANISM OF OXIDIZING PROCESSES IN DENITRIFICATION

O. I. Korochkina

Summary

Bact. denitrofluorescens has a normal respiratory system which may be suppressed by hydrocyanic acid.

Bact. denitrofluorescens is a strong oxidizer and transforms organic acids (lactic, pyruvic and propyonic) into CO_2 aud H_2O. It was difficult to determine the intermediate products of oxidation. Such are probably the acetic and formic acids.

It is possible that an intermediate product preceding the formation of acetic acid is acetoaldehyde which has been found in large quantities in media where glucose, fructose and glycerine had been taken as organic substances.

Loboratory of Microbiology of the
Moscow State University

СОДЕРЖАНИЕ

Стр.

В. О. Таусон. Энергетика процесса жиробразования 3
А. Н. Белозерский. О химической природе волютина 29
Б. И. Клейн. Понятие о виде в общей и медицинской микробиологии 35
С. З. Броцкая. Термофильные протеолитические бактерии. I. Ослабление протеолитической активности 45
З. Г. Разумовская и Л. Н. Белинькая. Влияние этилового спирта на процесс окисления сорбита в сорбозу при синтезе аскорбиновой кислоты 50
О. И. Корочкина. Механизм окислительных процессов в денитрификации 57

CONTENTS

W. O. Tausson. Energetics of the process of fat formation 3
A. N. Belozersky. On the chemical nature of volutin 34
B. I. Klein. The conception of species in general and medical microbiology 43
S. Z. Brockaia. Thermophylic proteolytic bacteria. I. Inactivation of proteolytic activity 49
Z. G. Razumovskaya and L. N. Belinkaya. Influence of ethyl alcohol on the oxidation of sorbite into sorbose in the synthesis of ascorbic acid 56
O. I. Korochkina. The mechanism of oxidizing processes in denitrification 64

Ответственный редактор *Б. Л. Исаченко*

Подписано к печати 14.II. 1945 Объем 4 печ. л. 7 уч.-изд. л. А14927
Тираж 2500 экз. Цена 8 руб. Зак. № 1357

18-я типография треста «Полиграфкнига» ОГИЗа при СНК РСФСР,
Москва, Шубинский, 10

Цена 8 руб.